

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA**



**Estudio de la hiperreactividad bronquial inespecífica en niños  
polínicos: valoración pronóstica de la posible evolución al  
asma en las polinosis**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**María Gloria García Hernández**

**Director**

**Ángel Nogales Espert**

**Madrid 2004**

**ISBN: 978-84-8466-967-8**

**© María Gloria García Hernández, 1994**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**ESTUDIO DE LA HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL  
INESPECIFICA EN NIÑOS POLINICOS. VALORACION  
PRONOSTICA DE LA POSIBLE EVOLUCION AL ASMA  
EN LAS POLINOSIS.**

**M<sup>a</sup> Gloria García Hernández**  
**Madrid, Septiembre 1994**

DON ENRIQUE CASADO DE FRIAS, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

Hace constar,

Que Doña MARIA GLORIA GARCIA HERNANDEZ ha realizado el trabajo titulado "ESTUDIO DE LA HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL INESPECIFICA EN NIÑOS POLINICOS. VALORACION PRONOSTICA DE LA POSIBLE EVOLUCION AL ASMA EN LAS POLINOSIS", - bajo la dirección del PROFESOR ANGEL NOGALES ESPERT, miembro de este departamento.

Este estudio se encuentra finalizado y puede ser defendido como TESIS DOCTORAL.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Enrique Casado de Frias', written in a cursive style.

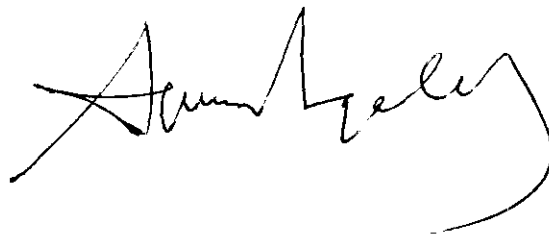
Madrid, a cinco de septiembre de mil novecientos noventa y cuatro.

DON ANGEL NOGALES ESPERT, CATEDRATICO DE PEDIATRIA DE LA UNIVERSIDA COMPLUTENSE DE MADRID.

Hace constar,

Que Doña MARIA GLORIA GARCIA HERNANDEZ ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado "ESTUDIO DE LA HIPERRREACTIVIDAD BRONQUIAL INESPECIFICA EN NIÑOS POLINICOS. VALORACION PRONOSTICA DE LA POSIBLE EVOLUCION AL ASMA EN LAS POLINOSIS", para ser defendido como TESIS DOCTORAL.

Dicho estudio se encuentra terminado y reúne, las condiciones para ser presentado como TESIS DOCTORAL.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Angel Nogales', with a large, sweeping flourish at the end.

Madrid, a cinco de septiembre de mil novecientos noventa y cuatro.

**DEDICATORIA:**

A Jose Enrique y a mis padres  
por su apoyo incondicional.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Prof. Angel Nogales Espert, por su constante estímulo gracias al cual he podido concluir esta Tesis.

A los Drs. José Ramón Villa Asensi y Antonio Martínez Gimeno, por su colaboración en la realización de este trabajo.

A todos los médicos, enfermeras y demás personal de la Sección de Neumología y Alergia Infantil del Hospital 12 de Octubre, por el apoyo que me han brindado en todo momento.

<b>I. INTRODUCCION</b>	1
<b><u>I.1. ANTECEDENTES Y CONSIDERACIONES GENERALES</u></b>	2
<b><u>I.2. HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL</u></b>	4
I.2.1. Factores que influyen sobre la HRB	5
I.2.1.1. Atopia	6
I.2.1.2. Infección	6
I.2.1.3. Contaminación atmosférica	10
I.2.1.4. Tabaco	11
I.2.2. Mecanismos responsables de la HRB	12
I.2.2.1. Liberación de mediadores	12
I.2.2.2. Sistema nervioso autónomo	21
<b><u>I.3. POLINOSIS</u></b>	38
I.3.1. Historia	39
I.3.2. Frecuencia	39
I.3.2. Etiopatogenia	40
I.3.4. Pólenes de importancia alergológica	45
<b><u>I.4. DIAGNOSTICO DE LA HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL</u></b>	52
I.4.1. Respuesta bronquial a la metacolina	53
I.4.2. Respuesta bronquial al ejercicio físico	60
<b><u>II. OBJETIVOS DEL TRABAJO</u></b>	66

<b><u>III.MATERIAL Y METODOS</u></b> .....	68
III.1.Población estudiada .....	69
III.2.Estudios complementarios .....	73
III.3.Método estadístico .....	84
III.4.Búsqueda bibliográfica .....	84
 <b><u>IV.RESULTADOS</u></b> .....	 85
IV.1.Diferencias clínicas y/o analíticas entre rinoconjuntivíticos y asmáticos .....	88
IV.2.Resultados e índices de validez de las pruebas de provocación bronquial .....	98
 <b><u>V.DISCUSION</u></b> .....	 124
V.1.Análisis de la muestra .....	125
V.2.Análisis de los resultados de las pruebas complementarias .....	134
V.3.Análisis de los resultados de las pruebas de provocación bronquial .....	141
 <b><u>VI.CONCLUSIONES</u></b> .....	 156
 <b><u>VII.BIBLIOGRAFIA</u></b> .....	 161



## **I. INTRODUCCION**

## **I.1.-ANTECEDENTES Y CONSIDERACIONES GENERALES**

En la actualidad es un hecho indiscutible que la patología alérgica en general y el asma en particular son cada vez más frecuentes, tanto en el niño como en el adulto. En el año 1983, la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (1) llevó a cabo una encuesta sobre una población de 3.000 personas mayores de 15 años, encontrando que el 15% de los encuestados padecía alguna enfermedad alérgica. De éstos, el 50% presentó sus primeros síntomas antes de los 14 años. Un estudio similar realizado en Suecia (2), sobre una población de 20.000 escolares, arrojaba una prevalencia de del 16.9%.

Dentro de las enfermedades alérgicas el asma ocupa un lugar primordial, tanto por su frecuencia como por la importancia de sus manifestaciones clínicas y sus posibles repercusiones familiares, escolares y sociales. En la encuesta antes referida (1) se encontró una prevalencia del 7%. Un estudio realizado, mediante encuesta-entrevista, por Enguidanos y Campos (3) sobre una población de 1.215 escolares residentes en Valencia y 415 de la zona rural, dio una prevalencia de asma del 6.92% para los primeros y 5.66% para los segundos.

Hay que tener en cuenta que el asma es un cuadro cuya definición aún no está claramente establecida. En 1963, la Sociedad Torácica Americana (4) introdujo la siguiente definición:

*“Asma es una enfermedad caracterizada por un incremento de la respuesta de la traquea y de los bronquios frente a una variedad de estímulos y manifestada por un estrechamiento de las vías aéreas que cambia en severidad, bien espontáneamente o como resultado del tratamiento”.*

En 1992 se introdujo una nueva definición, después de la reunión que condujo al primer Consenso Internacional sobre el diagnóstico y tratamiento del asma (5):

*“Asma es una enfermedad inflamatoria de la vía aérea en la que varias células, incluyendo los mastocitos y los basófilos, juegan un papel. En individuos susceptibles esta inflamación causa síntomas debido a una obstrucción del flujo aéreo, amplia pero variable, que a menudo es reversible, bien espontáneamente o con tratamiento, y causa un incremento en la respuesta de la vía aérea a una serie de estímulos”*

En ambas definiciones se introduce el concepto de hiperreactividad de la vía aérea, que sería el nexo común para todos los pacientes asmáticos.

## **I.2.- HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL**

Se llama hiperreactividad bronquial (HRB) a la sensibilidad anormal de las vías aéreas, que se expresa como un incremento de la obstrucción al flujo aéreo tras la exposición a diversos estímulos o agentes farmacológicos, químicos o físicos (6). Se trataría de una alteración funcional que clínicamente cursaría con broncoconstricción y constituiría una característica casi universal del asma. Estaría siempre presente, aunque en el momento en que se explorara al enfermo no se constatará la presencia de obstrucción bronquial.

La HRB no es exclusiva de los asmáticos sino que aparece en otras enfermedades, como la fibrosis quística y la enfermedad obstructiva crónica al flujo aéreo, aunque es probable que el mecanismo de producción sea diferente. Incluso puede detectarse, de forma transitoria, en individuos normales tras haber padecido una infección respiratoria.

Los estímulos no alérgicos capaces de provocar una broncoconstricción se dividen en:

a.- Agentes farmacológicos

- Agonistas colinérgicos: metacolina, carbachol
- Aminas vasoactivas: histamina, serotonina
- Péptidos vasoactivos: bradiquinina
- Metabolitos del ácido araquidónico:  $PGD_2$ ,  $PGF_2$ ,  $LTC_4$ ,  $LTD_4$
- Otros: adenosina, propranolol, metoxamina

b.- Estímulos físicos

- Ejercicio
- Hiperventilación isocápica con aire frío o ambiental
- Inhalación de suero salino hipertónico
- Inhalación de agua destilada

c.- Agentes químicos

- Dióxido de azufre y nitrógeno
- Acido cítrico
- Ozono
- Humo de tabaco

A este tipo de estímulos se les llama inespecíficos para diferenciarlos de los neuroalergenos y los sensibilizantes químicos, como los isocianatos, que afectan solo a los individuos que están sensibilizados a ellos.

**1.2.1.- Factores que influyen sobre la hiperreactividad bronquial**

Desgraciadamente hay poca información epidemiológica en cuanto a los orígenes y distribución de la HRB y obligatoriamente hay que referirse a los estímulos **inductores** y a los estímulos **incitadores**:

a.- Estímulos inductores:

Son aquellos que hacen reactivo a un individuo que anteriormente no lo era.

b.- Estímulos incitadores:

Son los que provocan la broncoconstricción en aquellos que ya son hiperreactivos.

Los primeros son claramente decisivos en la génesis del asma, sin embargo la exposición a los segundos aumentará la prevalencia de síntomas. Conocemos toda una serie de factores de riesgo que tienen una clara asociación con la inflamación de la vía aérea y con los orígenes del asma. La cuestión se plantea entorno a si estos mismos factores causan HRB y, de ser así, si tal HRB es un marcador de asma. Vamos a comentar algunos aspectos de los más importantes, entre los que se encuentran la atopia, la infección, la contaminación ambiental y el tabaco.

### **Y.2.1.1.- *Atopia***

La atopia es un término que se refiere a la particularidad que presentan algunas familias de padecer una serie de enfermedades entre las que se encuentran la fiebre del heno (rinitis alérgica), dermatitis atópica y asma. Hoy día se sabe que la atopia se debe a una serie de alteraciones inmunológicas que conducen a la producción exagerada de IgE.

Los estudios epidemiológicos más recientes sugieren una cierta asociación entre HRB y atopia (7, 8); sin embargo, parece que dicha asociación es mas evidente en los sujetos jóvenes (7). También se ha visto que cuando el sujeto evita el contacto con el alergen al que está sensibilizado disminuye la HRB (9) y que si se expone al mismo, en una prueba de provocación bronquial, se produce una respuesta exagerada tras la posterior inhalación de histamina o metacolina (10), especialmente si en la provocación alérgica se ocasionó una respuesta dual o tardía. La posibilidad de poder inhibir tanto este tipo de respuesta como la HRB inespecífica posterior con corticoides, apoya la relación entre HRB e inflamación de la vía aérea.

Pese a que algunos estudios demuestran que la atopia y la HRB pueden ser dos fenómenos independientes (11), que incluso se heredarían separadamente (12), parece mas probable la existencia de una asociación causal entre ambas.

### **Y.2.1.2.- *Infección***

Otro factor implicado, como causa de HRB, es la infección. Durante cierto tiempo se sostuvo que las bacterias, actuando como alergen, podrían ser asmogénicas, y esta idea fue la base para utilizar tratamientos denominados hiposensibilizantes con extractos bacterianos, cuya eficacia nunca fue probada (13). Sin embargo, sí existen muchos estudios que apoyan la relación entre viriasis y asma, especialmente en los niños (14, 15).

En los primeros años de vida la causa principal de las sibilancias son las infecciones respiratorias virales. Se sabe que cerca del 42% de las crisis de asma que precisan ingreso, en niños menores de 5 años, se deben a una infección viral, siendo el virus sincitial respiratorio (VSR) el más frecuentemente implicado. En niños mayores de 5 años el primer patógeno es el *Mycoplasma pneumoniae*. Por encima de los 10 años la infección respiratoria es una causa infrecuente de asma, aunque esta posibilidad persista hasta en el adulto.

Se ha comprobado el aumento de HRB tras una infección de vías respiratorias superiores (16) así como después de la gripe (17), pero estudios posteriores no han encontrado una relación tan clara entre infección respiratoria de vías altas e HRB (18). Quizás esto pueda explicarse sabiendo que no todos los asmáticos son propensos a presentar sibilancias en el curso de infecciones virales, ni todos los virus respiratorios, ni todas las cepas del mismo virus son capaces de ocasionarlas. Halperin y cols. (19) infectaron con rinovirus a un grupo de adultos sanos y no observaron modificaciones en las espirometrías practicadas ulteriormente, ni en las pruebas de provocación con histamina. En un trabajo posterior, los mismos autores inocularon rinovirus a un grupo de asmáticos y vieron que solo el 16.5% presentó una reducción del volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV<sub>1</sub>) igual o superior al 10%, a la vez que un aumento de sensibilidad tras la provocación con histamina (20).

Otro aspecto interesante de la infección viral, en relación con el asma, es que aquella pueda actuar como desencadenante de éste. Por ejemplo, Pullan y Hey (21) estudiaron a un grupo de 130 niños que habían padecido una infección respiratoria de vías bajas por VSR en los primeros 5 años de vida. Vieron que el 42% había seguido presentando sibilancias después del primer episodio, aunque solo el 6.2% continuaban sufriendo crisis de asma a los 10 años. El número de sensibilizaciones alérgicas no difería de las de un grupo control. Otros autores han llegado a conclusiones semejantes (22). Sin embargo, Zweiman y cols.(23), observando la evolución de 25 niños ingresados por bronquiolitis en el primer año de vida, vieron que a los 5 años el 50% aún presentaba sibilancias recurrentes. En este grupo los antecedentes personales y familiares de alergia era mayor que en la población general.

Parece que cuando un individuo sano padece una infección respiratoria de vías altas, puede detectarse una HRB transitoria en el mismo, mientras que, en un asmático, la misma infección se comportaría como una agresión adicional y el paciente podría presentar una crisis de asma o, por lo menos, objetivarse un claro aumento de la HRB medida con pruebas de provocación bronquial. En cualquier caso el resultado va a depender de la edad del sujeto, la importancia de HRB subyacente y del propio virus infectante.

Para explicar como la infección respiratoria puede desencadenar asma se barajan tres hipótesis:

1º.- La infección respiratoria desencadena HRB persistente.

2º.- La existencia de una HRB previa hace que, cuando el sujeto se infecte, manifieste asma.

3º.- Tanto la infección como la HRB necesitan un factor adicional, que podría ser la atopia, para que el sujeto se vuelva asmático.

En cualquier caso parece que los virus dan lugar a HRB, ocasionando fenómenos de inflamación a nivel de la pared bronquial. Esto se llevaría a cabo a través de los siguientes mecanismos:

**a.- Lesión del epitelio bronquial:**

Los virus colonizan y se replican en las células epiteliales del aparato respiratorio al que lesionan. Como resultado de esto, las uniones intercelulares se abren y aumenta la permeabilidad del epitelio, facilitando el acceso de sustancias extrañas desde la luz bronquial. Estas pueden llegar a contactar con los mastocitos de la submucosa sensibilizándolos (24). Además, los receptores de las terminaciones nerviosas aferentes quedan expuestos a los mediadores inflamatorios (25). Esto puede dar lugar a la aparición de HRB como resultado de un reflejo broncoconstrictor mediado por los nervios excitadores colinérgicos y no colinérgicos.



Dentro de la respuesta inflamatoria se produciría la migración de neutrófilos, que se activarían y liberarían factores lipídicos que, a su vez, actuarían sobre el músculo liso aumentando la HRB.

Por otra parte, se sabe que las vías aéreas centrales están recubiertas por una fina película líquida, que puede disminuir durante la infección viral a causa de la respiración bucal, la hiperventilación y la fiebre. Si se pierde agua aumenta la osmolaridad y se modifica el gradiente osmótico a través del epitelio, produciéndose una disminución de la resistencia eléctrica y un flujo de solutos y agua hacia la pared, que deteriora aún más las uniones intercelulares. Como los receptores aferentes irritativos están localizados en la proximidad de dichas uniones, este mecanismo contribuiría a su excitación. Además, el aumento de la osmolaridad eleva la capacidad de liberar mediadores de la inflamación por parte de basófilos y mastocitos (26).

#### **b.- Respuesta inmunológica**

Se sabe que los virus son capaces de desencadenar la producción de IgE. Welliver y cols. (28) estudiaron a 42 lactantes infectados por VSR y observaron que los pacientes que sufrirían bronquiolitis o asma presentaban IgE unida a las células epiteliales de la nasofaringe, a los 7-10 días de haberse iniciado el proceso, en el 70-80% de los casos, mientras que esto solo sucedía en el 33% de los niños que padecían neumonía o infección respiratoria de vías altas. Además, el primer grupo presentaba mayor número de antecedentes familiares de asma que el segundo. En un estudio posterior con 79 lactantes infectados por VSR encontraron títulos máximos de IgE anti-VSR en los que tenían sibilancias, observándose buena correlación entre la concentración de histamina en secreciones nasales y los niveles mas bajos de  $\text{PaO}_2$  (29).

Cabe suponer que la IgE producida frente a un determinado virus sensibilice a los mastocitos y, tras una nueva exposición, se produzca la liberación de mediadores y la correspondiente inflamación bronquial.

No hay que olvidar que los virus también dan lugar a una respuesta celular inmune. Los linfocitos activados inducirían la producción de IgE y servirían como amplificadores de la respuesta inmune, liberando factores solubles que aumentarían la liberación de mediadores por parte de las células inflamatorias (30).

#### **c.- Reducción de la función $\beta$ -adrenérgica**

Se ha comprobado que, tras incubar leucocitos humanos con rinovirus, se produce una disminución en la síntesis de AMPc en respuesta al isoproterenol (31). Hay que destacar que éstas alteraciones solo se han podido observar en los leucocitos periféricos pero no en el músculo liso bronquial, por lo que cabe suponer que éste pudiera no reaccionar de la misma forma.

#### ***L2.1.3.-Contaminación atmosférica***

Se ha incriminado a la contaminación atmosférica como uno de los motivos de la prevalencia de la HRB en la sociedad moderna. Es de todos conocido que la presencia de una densa niebla con humo (smog) en determinadas poblaciones da lugar a un aumento de los cuadros respiratorios entre sus habitantes, especialmente los que ya sufrían asma, bronquitis o enfermedades cardíacas (32).

Algunos agentes habituales de la contaminación ambiental, como el dióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ), el ozono, el óxido nitroso y algunas partículas, son irritantes y podrían ocasionar HRB. Pero la mayor parte de los estudios han encontrado dificultades para asociar el aumento de alguno de ellos con la sintomatología clínica. Por ejemplo, en un brote de asma ocurrido en Barcelona en 1985, coincidiendo con una inversión térmica y un aumento de la contaminación atmosférica, no se pudo demostrar ninguna correlación entre los síntomas y el incremento de las concentraciones de óxido nitroso o de  $\text{SO}_2$  en la atmósfera (33). Por otra parte, parece que el número y gravedad de las crisis asmáticas aumenta cuando se eleva la contaminación (34). A la vista de los diversos estudios epidemiológicos realizados, hoy se piensa que existen pocas bases que apoyen el hecho de que el

asma se inicie gracias a la presencia de contaminación atmosférica, pero sí que la existencia de altos niveles de polución puedan hacer que los asmáticos presenten reactivación de sus síntomas.

#### **Y.2.1.4.- *Tabaco***

El tabaco sí que parece estar más claramente asociado a la inflamación de la vía aérea y a la HRB. Se ha comprobado que, entre fumadores no asmáticos, cuanto más baja es la función respiratoria basal más frecuente e intensa es la HRB (35). Pero es más discutible la presencia de HRB en los asmáticos que presentan una función pulmonar en límites normales. En conjunto parece que la HRB en fumadores no asmáticos se adquiere generalmente muchos años después de empezar a fumar y una vez establecida se mantiene aunque el sujeto deje el tabaco (36).

Por otra parte, se ha observado que los fumadores no asmáticos presentan mayor sensibilización a ciertos alergenios ocupacionales (37), niveles de IgE sérica elevados y mayor número de eosinófilos en sangre periférica (38). Sin embargo, no se ha encontrado correlación entre la cantidad de eosinófilos en sangre periférica, o los niveles de IgE en sangre, y la HRB (39). Además, se sabe que el dejar de fumar (36) y los corticoides inhalados (40) son medidas más eficaces para disminuir la HRB de los asmáticos que la de los fumadores no asmáticos. Probablemente esto indica que el tipo de inflamación a nivel de la pared bronquial es diferente en ambos grupos.

En cuanto a los niños, existen varios estudios que ponen de manifiesto que la HRB empeora en asmáticos fumadores pasivos (41, 42), pero hoy por hoy no se puede asegurar que el tabaco induzca HRB o aumente el riesgo de desarrollar asma en niños sanos (43).

### **Y.2.2.- Mecanismos responsables de la hiperreactividad bronquial**

La siguiente cuestión que surge se sitúa en torno a los mecanismos responsables de la producción de HRB. Estos todavía no se conocen en detalle, pero todos los autores están de acuerdo en que en los mismos participan la inflamación de las vías aéreas y las anomalías en el control del músculo liso bronquial por los neurotransmisores (44).

#### ***1.2.2.1.- Liberación de mediadores e inflamación***

Los alérgenos inhalados o los sensibilizantes químicos pueden causar respuestas asmáticas precoces o tardías aisladas o duales. La respuesta inmediata se presenta entre los 5 y 20 minutos después de la inhalación del antígeno y cede en 30-60 minutos. A las 4-6 horas puede producirse una reacción tardía que dura hasta 36 horas. Algunos pacientes tienen reacciones duales.

Actualmente se piensa que la reacción asmática precoz está mediada, predominantemente, por los mastocitos. Este tipo de respuesta se inhibe fácilmente por la administración previa de  $\beta$ -adrenérgicos inhalados o cromoglicato disódico. El tratamiento corticoideo prolongado también atenúa la reacción inmediata, posiblemente por disminuir los mastocitos en el epitelio bronquial.

La reacción tardía se caracteriza por la afluencia de células inflamatorias hacia la pared bronquial. Se ha descrito aumento de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos pulmonares y linfocitos en el lavado broncoalveolar obtenido entre las 6 y las 48 horas después de la provocación antigénica (45). La magnitud de la respuesta alérgica tardía se ha relacionado con la duración y gravedad de la HRB posterior. También se ha visto que otros pacientes, con respuesta dual, ya manifiestan aumento de la HRB después de haberse superado la respuesta inmediata y antes de que se manifieste la respuesta tardía (46), lo que indicaría la existencia de cambios precoces en la vía aérea que preluirían el incremento de la HRB, precediendo incluso a la aparición de la clínica de la respuesta tardía.

Las células principales implicadas en la liberación de mediadores, y en los posteriores mecanismos de inflamación, son los mastocitos y los basófilos. Ambos poseen en su superficie receptores de alta afinidad para la IgE. En el hombre los mastocitos se localizan en el epitelio bronquial, en la submucosa y en el parénquima pulmonar. No se ha detectado la presencia de basófilos en dicho epitelio, aunque tampoco se descarta.

Cuando se enfrentan basófilos sensibilizados con los correspondientes antígenos se produce un fenómeno por el que las moléculas de IgE, unidas a sus receptores de membrana, se trasladan y forman un "casquete" en uno de los polos de la célula. Los antígenos bivalentes se unen a dos de estas moléculas de IgE específicas en el fenómeno que se ha dado en llamar "puenteo", produciéndose la aproximación de dos moléculas contiguas de IgE, junto con sus receptores. Este hecho constituye una señal que induce una serie de cambios en la membrana, y después en la propia célula, que desembocará en la liberación de mediadores. Los acontecimientos se desarrollan de la siguiente manera:

#### 1º.- Activación de una enzima proteolítica

Se ha visto que un potente inhibidor de la serinesterasa, el diisopropil fluorosfosfato (DFP), inhibe la metilación fosfolipídica inducida por el antígeno, el aumento de AMPc intracelular, la captación de calcio y la liberación de histamina por los mastocitos de la rata y los basófilos humanos (47). Esto sugiere la existencia de una enzima proteolítica ligada a la membrana que se activa después de la aproximación de los receptores de membrana, tras el fenómeno de "puenteo" y antes de que se produzca la activación de las metiltransferasas, que constituye el paso siguiente.

#### 2º.- Activación de las metiltransferasas

En la membrana celular existen dos metiltransferasas:

a) **Metiltransferasa I.** se encuentra en la vertiente citoplasmática de la membrana y actúa transfiriendo un grupo metilo a la fosfatidil-etanolamina para formar fosfatidil-N-monometil-etanolamina.

b) **Metiltransferasa II**: se encuentra en la superficie externa y actúa transfiriendo dos grupos metilo de forma sucesiva, lo que da lugar a la formación de fosfatidilcolina.

Después de producirse el fenómeno de “puente” se detecta un aumento transitorio de la incorporación de grupos 3H-metilo a los fosfolípidos de membrana, que alcanza el punto máximo a los 15 segundos (48). A la metilación fosfolipídica sigue un incremento en la captación de calcio que alcanza una meseta a los 2-3 minutos, mientras que la liberación máxima de histamina se produce al cabo de 5-8 minutos (49).

### **3º.- Activación de la adenilciclase**

Otra consecuencia del fenómeno de “puenteo” lo constituye la activación de la adenilciclase. Se ha visto que a los 30 minutos de la exposición de los mastocitos del pulmón y de los basófilos humanos a suero que contenga anticuerpos anti-IgE, se produce un aumento monofásico del nivel de AMPc intracelular (49). Además, se produce la activación de la proteinkinasa A.

### **4º.- Activación de la fosfolipasa C**

Una más de las enzimas ligadas a la membrana, que se activan tras el fenómeno de “puenteo”, es la fosfolipasa C. Esta hidroliza uno de los lípidos del inositol, el fosfatidilinositol 4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>). Este último se libera hacia el interior de la célula y moviliza el calcio intracelular del retículo endoplásmico, fenómeno que se detecta antes de que se produzca el aumento de la metilación fosfolipídica y el incremento del AMPc (50). El diacilglicerol (DAG), acumulado en la membrana, activa a la proteinkinasa C (51), mientras que el liberado hacia el interior de la célula da lugar a la activación de la DAG-lipasa, que actuando sobre el DAG produce monoacilglicerol (MAG). La MAG-lipasa actúa sobre este último, convirtiéndole en glicerol y ácido araquidónico libre, o bien lo hace la MAG-kinasa, dando lugar a ácido lisofosfatídico (LPA).

Todos estos productos (DAG, MAG, LPA y lisofosfatidilcolina) son fusógenos activos de membrana y podrían actuar facilitando la fusión granular y la degranulación posterior. Queda por dilucidar cómo se produce el acoplamiento entre los receptores IgE de la membrana y estas

enzimas, el papel real de la enzima proteolítica, que se comentaba en el primer punto, y el de las proteinkinasa A y C en la liberación de mediadores.

A los pocos minutos de producirse la agresión antigénica, en personas atópicas, se observa una elevación de histamina en el plasma, así como de ésta y de la triptasa mastocitaria en el líquido obtenido tras lavado broncoalveolar (LBA) (52). En las horas siguientes se puede detectar el principal catabolito de la histamina, la N-metilhistamina, en orina. Los mastocitos obtenidos de las vías aéreas, mediante lavado, en los 15 primeros minutos de la agresión alérgica, tienen todas las características morfológicas de la degranulación no-citotóxica (53). Los mastocitos pulmonares humanos también elaboran LTC<sub>4</sub>, prostaglandina D<sub>2</sub>, PAF y varios péptidos quimiotácticos, enzimas proteolíticas y proteoglicanos. Sin embargo, el papel de todos estos mediadores todavía se desconoce en su mayor parte. Sí se ha visto que en el asma crónica hay una relación inversa entre la respuesta a la metacolina, el porcentaje de mastocitos (54) y la cantidad de histamina en el líquido del LBA (55).

En cuanto a la reacción de fase tardía, parece que los mastocitos juegan un papel importante a través de los factores quimiotácticos que liberan y atraen a eosinófilos, neutrófilos y basófilos.

Por último, no hay que olvidar que los mastocitos, no solo intervienen en la broncoconstricción desencadenada tras la exposición alérgica, sino que también lo hacen en la provocación con ejercicio, aire frío e hiperventilación (56).

Otras células implicadas en los procesos de broncoconstricción e inflamación son los monocitos y macrófagos. Ambos poseen receptores de baja afinidad para la IgE y son las células que predominan en los LBA, tanto de sujetos normales como de los asmáticos.

Los macrófagos tienen capacidad para producir una amplia variedad de mediadores lipídicos que incluyen a los metabolitos del ácido araquidónico, tanto a través de la vía de la ciclo-oxigenasa como de la lipo-oxigenasa, así como al factor de activación plaquetaria (PAF). Tras la provocación

con alérgeno se observa un aumento apreciable de macrófagos en el LBA (45). También son activados los macrófagos pulmonares en la reacción de fase tardía (57).

Se ha observado que cuando un individuo sano inhala PAF se produce un estado de HRB que disminuye en pocas horas, y no retorna a la situación basal hasta pasados varios días o semanas (58). El mecanismo de actuación se atribuye a la producción de histamina endógena y a la atracción que el PAF ejerce sobre los eosinófilos (59).

En cuanto a los monocitos parece que migran al interior del pulmón durante la provocación antigénica. Se ha constatado que los asmáticos crónicos graves, parcialmente respondedores a los corticoides, tienen un número aumentado de monocitos circulantes activados (60), e histológicamente se ha visto que las lesiones inflamatorias de las vías aéreas de sujetos asmáticos contienen monocitos. Hoy por hoy no está claro si estas células contribuyen activamente a la fisiopatología del asma, o actúan desplazando o modulando los efectos que producen otras células y sus mediadores, o lo hacen de ambas maneras.

Otra de las células implicadas en la reacción de broncoespasmo e inflamación es el eosinófilo. Es de sobra conocida la asociación entre asma, eosinofilia y presencia de cristales de Charcot-Leyden en el esputo. Posteriormente se ha podido constatar la relación inversa existente entre los valores de FEV<sub>1</sub> y el número de eosinófilos en sangre periférica (61), así como la correlación positiva entre la eosinofilia y la gravedad clínica de la enfermedad (62). También se ha observado que la fase tardía de la reacción asmática, pero no la precoz aislada, se acompaña de eosinofilia (63), y de una respuesta más intensa a la provocación con histamina o metacolina en los pacientes con más eosinófilos circulantes (64). Griffin y cols. (65) han sido capaces de hallar una correlación inversa entre el número de eosinófilos sanguíneos y los valores del peak-flow de los pacientes asmáticos, antes de que éstos iniciaran el tratamiento corticoideo. Después de dicho tratamiento, se establecía una correlación inversa entre los niveles sanguíneos de la proteína catiónica del eosinófilo (ECP) y el peak-flow, sugiriendo que la relación real se establecería entre la gravedad del cuadro y el número de eosinófilos activados, pero no con los totales. Otros autores



han puesto de manifiesto la disminución de eosinófilos activados (hipodensos) en sangre periférica después de solo 14 días de tratamiento con budesonida inhalada, coincidiendo también con la mejoría clínica (66). Mediante LBA se ha observado que durante las reacciones de fase tardía inducidas por alérgeno se produce acumulación de eosinófilos y de sus productos (57). También se ha intentado relacionar la celularidad obtenida mediante LBA y la respuesta a las pruebas de broncoprovocación. Algunos autores han observado que solo los pacientes que presentan más eosinófilos y macrófagos en el líquido de dicho lavado respondían a la metacolina o a la histamina antes que los demás (67), mientras que otros encuentran el mismo tipo de respuesta en los que presentan los niveles más altos de eosinófilos, mastocitos y células epiteliales (68). La divergencia de resultados se explica teniendo en cuenta que el número de pacientes incluidos en cada estudio suele ser escaso, y el grado de afectación de los mismos diferente.

Los hallazgos obtenidos mediante biopsia pulmonar tampoco han permitido aclarar del todo el papel de los eosinófilos en el asma y en la hiperreactividad bronquial. En la submucosa de pacientes asmáticos se ha observado la presencia de un infiltrado celular rico en eosinófilos. Estos pueden estar degranulados en parte (69). Los pacientes más graves tienden a presentar los infiltrados más importantes (62). Como también se ha comprobado la existencia de un mayor número de linfocitos T activados, se ha postulado que sustancias producidas por los mismos podrían ejercer una acción quimiotáctica sobre los eosinófilos (70). Además, se han encontrado mastocitos degranulados (71) y neutrófilos (72), aunque no todos los autores están de acuerdo con estos hallazgos (73). Así mismo, se ha intentado correlacionar el grado de respuesta a la provocación bronquial con metacolina y los hallazgos biopsicos, pero los resultados obtenidos son controvertidos. Algunos autores sí que han obtenido una relación inversa entre el grado de respuesta a la metacolina y el daño del epitelio bronquial (74), pero otros no (75). En cuanto al tipo de infiltrado celular, no se ha visto correlación entre el grado de hiperreactividad bronquial y el número de eosinófilos, neutrófilos o mastocitos, a diferencia de lo que ocurre con el LBA (76). Cuando la biopsia bronquial se lleva a cabo después de haberse realizado una provocación bronquial con antígeno, se ha podido comprobar que existe un aumento de eosinófilos en el epitelio, pero solo si el sujeto presentó una respuesta dual (77). En pacientes tratados con corticoides inhalados

durante 4 meses, se ha observado la ausencia de eosinófilos en las muestras biópsicas, pese a que la respuesta bronquial a la metacolina apenas se modifique (78).

Hay que recordar que el eosinófilo posee en su membrana **receptores de baja afinidad para la IgE**, además de otra serie de receptores para C3b y C4. Esta IgE interviene en la lucha frente a los parásitos, aunque parece que ciertos alérgenos podrían inducir la liberación de proteínas granulares a través de ella (79). Además, en la membrana se encuentra la **proteína CLC** (Charcot-Leyden crystal) que es una lisofosfolipasa, y otra serie de proteínas, ninguna de las cuales ha sido identificada correctamente hasta el momento actual, pero se sabe que reconocen anticuerpos producidos frente a los eosinófilos cuando se enfrentan a un suero que los contiene.

Dentro de los gránulos del eosinófilo nos encontramos con la **proteína básica mayor** (Major Basic Protein, MBP) que se sitúa en el núcleo cristalino del gránulo y constituye el 55% de las proteínas contenidas en el mismo. Se conoce su toxicidad para los parásitos y para las células tumorales de muchos mamíferos, pero lo que más nos interesa es su propiedad de estimular la liberación de histamina por parte de los basófilos y de los mastocitos. En la matriz del gránulo se sitúa la **proteína catiónica del eosinófilo** (Eosinophil Cationic Protein, ECP). Tanto ésta como la MBP son citotóxicas para el epitelio respiratorio (80), y ambas pueden contribuir a la denudación epitelial observada en el asma. Se ha encontrado correlación inversa entre la respuesta a la provocación con metacolina por un lado y el porcentaje de eosinófilos, células epiteliales y cantidad de MBP en el LBA (81). También en la matriz del gránulo se encuentra la **neurotoxina derivada del eosinófilo** (Eosinophil-Derived Neurotoxin, EDN) que parece idéntica a otra proteína del eosinófilo llamada **proteína X** (Eosinophil Protein-X, EPX), ambas con propiedades antihelmínticas. Así mismo, en la matriz del gránulo se encuentra la **peroxidasa del eosinófilo** (Eosinophil Peroxidase, EPO) que no es exactamente igual que la peroxidasa del neutrófilo o del monocito. En presencia de  $H_2O_2$ , que también es generada por el eosinófilo, oxida elementos halóidos y forma ácidos hipoalosos muy reactivos, capaces de matar parásitos, bacterias, virus y hongos. Además, puede unirse al mastocito e inducir su degranulación, ayudando a perpetuar la respuesta inflamatoria (82).

Por último, se ha visto que el eosinófilo es capaz de sintetizar el **factor de activación plaquetaria** (Platelet Activating Factor, PAF), mediante una reacción de acetilación que implica a la acil-CoA acetiltransferasa. Se ha comprobado que algunas sustancias quimiotácticas para los eosinófilos, como la ECF-A y el C5a, son capaces de estimular la actividad de este enzima y aumentar así la síntesis y liberación del PAF (83). A su vez, este último actúa como un factor quimiotáctico para los eosinófilos, además de aumentar la producción de LTC<sub>4</sub> y otros leucotrienos a partir del ácido araquidónico y a través de la vía de la lipo-oxigenasa (84). Como ya hemos apuntado estas sustancias son potentes broncoconstrictoras y aumentan la permeabilidad vascular.

Existe cierta controversia a cerca de cual es el papel que juegan los neutrófilos en el desencadenamiento y perpetuación de la HRB y el asma. En principio parece que estas células se encuentran habitualmente en las grandes vías aéreas, no habiendo prácticamente diferencias en los recuentos efectuados en los LBA de sujetos sanos, pacientes con rinoconjuntivitis polínica y asmáticos leves (85). Sí parece que los neutrófilos de sangre periférica se activan tras producirse una repuesta asmática precoz o de fase tardía, inducidas por alergenos (86) o por el ejercicio (87). También se han observado aumentos significativos del porcentaje de neutrófilos en el LBA de sujetos que experimentaron reacciones de fase tardía tras la provocación antigénica (57). Así mismo, se ha detectado la presencia de una sustancia activadora de la quimiotaxis neutrofílica de alto peso molecular (High Molecular Weight Neutrophil Chemotactic Activation, HMW-NCA) en el torrente circulatorio de pacientes con reacciones precoces y tardías inducidas por alergenos o por ejercicio (88). Este HMW-NCA puede derivarse de los linfocitos, de los monocitos o de ambos y está relacionado con el factor 10 kD quimiotáctico neutrofílico (89). La acumulación de neutrófilos en las vías aéreas durante la inflamación puede producir lesiones tisulares a través de la liberación de metabolitos del oxígeno, de las proteasas y de material catiónico. Además, el neutrófilo es una fuente potente de muchos mediadores como las prostaglandinas, tromboxanos, LTB<sub>4</sub> y PAF que pueden contribuir a la respuesta inflamatoria.

Una hipótesis, que ha atraído a diversos investigadores, ha sido la posibilidad de que las plaquetas actuaran como fuente importante de mediadores lipídicos en el asma (90). Por un lado las

plaquetas contienen en su superficie receptores de baja afinidad para la IgE, por otro algunos experimentos en animales y la presencia del factor 4 en el plasma de sujetos atópicos sustentaban esta relación. Actualmente no existen pruebas que apoyen un papel destacado de las plaquetas en la génesis del asma ni de la HRB.

Los linfocitos ocupan un lugar clave en la regulación y expresión de los procesos inflamatorios asociados con la alergia y el asma. Las linfokinas derivadas de las células T, IL-4, IL-5 y IFN- $\gamma$ , intervienen en la regulación de la producción de IgE. Algunas, como la IL-5, GM-CSF y IL-3, actúan controlando la producción de eosinófilos por la médula ósea y regulando la diferenciación de los mastocitos. Otras tienen actividad quimiotáctica para los neutrófilos, eosinófilos y basófilos, así como para los monocitos y pueden activar o degranular estas células efectoras. Se ha visto que, en las biopsias bronquiales de sujetos afectados de asma leve, existe un aumento intraepitelial de linfocitos T activados (91), mientras que en sangre periférica se ha demostrado la presencia de un aumento de la actividad de las células natural killer (92), lo que constituye un indicador más de la actividad linfocitaria incrementada. Por último, se ha observado una correlación significativa entre el grado de obstrucción de las vías aéreas, medido por peak-flow, y los porcentajes de linfocitos TCD4+ en sangre periférica que muestran receptores para la interleukina 2 (Interleukin-2 Receptors, IL-2R), así como con las concentraciones séricas de IL-2 (93).

Hasta hace poco se consideraba que las células epiteliales que recubren la vía aérea constituían un mero revestimiento mecánico. Hoy día se sabe que son capaces de liberar mediadores provenientes del ácido araquidónico por la vía de la lipo-oxigenasa, como el ácido 15-hidroxiicosatetranoico (15-HETE) y el 8,15 di-HETE (94). Estas sustancias tienen poder quimiotáctico para los neutrófilos y son capaces de liberar mediadores por parte de los mastocitos. Así mismo, cuando el epitelio de la vía aérea es expuesto a la MBP, o a alérgenos, puede liberar ciertos péptidos broncoconstrictores, como la endotelina 1 (95).

Por otra parte, la inflamación de la vía aérea podría originar una disminución de la producción del factor relajador del epitelio (96). A su vez, esta inflamación impediría que actuasen sobre las taquikinas broncoconstrictoras, como la sustancia P, enzimas del tipo de la endopeptidasa neutra o encefalinasa, que se encuentran en la superficie de las células epiteliales de la vía aérea (97).

En resumen, parece que los neutrófilos, eosinófilos, mastocitos, basófilos, monocitos, plaquetas, linfocitos y células epiteliales intervienen de alguna manera en el desarrollo de la HRB y del asma. En la actualidad no es posible decidir la importancia de cada tipo de célula en particular, aunque lo que parece más probable es que actúen conjuntamente en una compleja cascada. También existe la posibilidad de que las células y sus mediadores puedan tener distinta importancia en las diversas formas de hiperrespuesta y en diferentes momentos de su historia natural.

#### ***1.2.1.4.- El Sistema Nervioso Autónomo***

El Sistema Nervioso Autónomo (SNA) constituye la parte del sistema nervioso que controla las funciones propias de las vísceras del cuerpo. Así, interviene en la regulación de la presión arterial, temperatura corporal, sudoración, motilidad y secreción gastrointestinal etc. Las señales de este sistema se transmiten a través de dos subdivisiones principales denominadas Sistema Nervioso Simpático y Parasimpático.

Interpuestos entre el sistema nervioso central y las estructuras viscerales, existen unas agregaciones neuronales llamadas **ganglios autónomos**. Las células de estos ganglios tienen una relación sináptica con las fibras de la médula espinal o del cerebro y envían axones que terminan en uno de los tres efectores viscerales: el músculo liso, el miocardio y el epitelio glandular. Por lo tanto, a diferencia de lo que ocurre con el músculo estriado, que está inervado directamente por axones de neuronas centrales, en el Sistema Nervioso Autónomo existen dos sistemas de neuronas. La primera **neurona pregangliónica** conduce el impulso desde el sistema nervioso central a algún

ganglio autónomo y, aunque puede pasar por varios ganglios, solo hace una sinapsis. La segunda **neurona postgangliónica** transmite el impulso desde el ganglio a las células efectoras.

Los **ganglios autónomos** se dividen en tres grupos:

**1°.- Vertebral o lateral:**

Se disponen de modo segmentario a lo largo de la superficie ventrolateral de la columna vertebral y se conectan entre sí, por medio de fibras longitudinales, para formar dos troncos simpáticos o cuerdas ganglionares.

**2°.- Prevertebral o colateral:**

Se encuentran en los plexos neurales mesentéricos.

**3°.- Terminal o periférico:**

Se sitúan dentro o cerca de las estructuras a las que inervan.

Tres de las salidas de las neuronas preganglionares conectan el sistema nervioso central con los ganglios autónomos. La salida craneal contiene fibras viscerales eferentes de los pares craneales (oculomotor, facial, glossofaríngeo y vago) que van hacia los ganglios autónomos terminales. La salida toracolumbar se compone de neuronas que provienen del núcleo simpático lateral de la médula espinal, que pasa por las raíces ventrales de la C8, todas las torácicas y dos o tres nervios lumbares superiores. Estas neuronas salen de las raíces ventrales, como los ramos comunicantes blancos, entran en el tronco o en los ganglios mesentéricos colaterales. La salida sacra contiene neuronas eferentes de los núcleos infralateral y medial parasimpático de la médula, que pasan a través de las raíces ventrales de los nervios sacros II, III y IV y van hacia los ganglios terminales asociados a los órganos pélvicos (98).

La mayoría de las vísceras reciben una inervación autónoma doble. Una proviene de la salida toracolumbar, que inerva a todas las estructuras viscerales del cuerpo y emplea noradrenalina como neurotransmisor. La otra procede de las salidas craneal (que inerva a las estructuras viscerales

de la cabeza, tórax y parte de las vísceras abdominales) y sacra (que inerva a los órganos pélvicos) y utiliza la acetilcolina. El primer sistema se denomina Sistema Autónomo Simpático y el segundo Parasimpático. Las acciones de cada uno de ellos son antagonistas de las del otro.

Además de estos dos sistemas, existen una serie de tejidos simpáticos o cromafínicos, llamados así por la tinción que adquieren con el bicromato de potasio y el ácido crómico sobre ellos, que están constituidos por la médula suprarrenal, los paraganglios y diferentes células cromafínicas extrasuprarrenales. Los precursores de las células cromafínicas derivan de la cresta neural embrionaria. Después de migrar fuera del sistema nervioso se convierten en células medulares suprarrenales y células paraganglionares (incluido el paraganglio aórtico u órgano de Zuckerkandl), o elementos cromafínicos del cuerpo carotídeo, o estructuras homólogas relacionadas con los grandes vasos del tórax.

En estado de reposo hay un potencial eléctrico a lo largo de la membrana celular de la neurona, que se denomina **potencial de reposo**. Este potencial existe porque la membrana celular en reposo es ligeramente permeable a iones sodio y muy permeable a iones potasio. La concentración de iones sodio es alta en la superficie externa (carga positiva) y baja en la superficie interna (carga negativa). Estos gradientes iónicos se mantienen gracias a un mecanismo de bomba que depende del ATP e implica a la adenil trifosfatasa (ATPasa), que es activada por el sodio en la superficie externa y por el potasio en la interna. Cuando se produce la estimulación, una región de la membrana se hace temporalmente permeable a los iones sodio, que penetran en el axoplasma y disminuyen la carga negativa en el interior. Esto hace que se establezca una corriente electrónica que despolariza las partes adyacentes del axolema y da lugar al llamado **potencial generador**, que a su vez origina un **potencial de acción** que se propaga solo, avanzando como un impulso despolarizador, a lo largo del axón. Este acaba en el **botón terminal**, que está en contacto con un pericarion de conducción cetrífuga o con dendritas de conducción centrípeta de una segunda neurona (99). La aproximación de estos elementos celulares se denomina **unión neuronal**, de la que se conocen dos tipos:

### 1º.- Sinapsis:

Es una unión que involucra a dos elementos nerviosos, como ya hemos comentado. Está constituida por la membrana presináptica del axón y la membrana postsináptica de la dendrita o del pericarion, existiendo entre ambas una hendidura de unos 200-300 Å de anchura. El impulso se transmite por medio de sustancias neurotransmisoras.

### 2º.- Unión neuroefectora:

Se establece entre una terminal nerviosa y una célula efectora no nerviosa, como puede ser el músculo, una glándula exocrina etc.

Ya hemos comentado que cada uno de los dos sistemas autónomos poseen diferentes neurotransmisores. El principal neurotransmisor del Sistema Simpático es la noradrenalina, por lo que también se le llama Sistema adrenérgico, mientras que al Parasimpático se le llama Colinérgico, por ser la acetilcolina la sustancia que ejerce como neurotransmisora. Todas las neuronas preganglionares del Sistema Nervioso Autónomo, incluidas las fibras que inervan la medula suprarrenal, todas las neuronas posganglionares de las salidas craneal y sacra y todos los nervios motores somáticos son colinérgicos, mientras que casi todas las neuronas posganglionares simpáticas son adrenérgicas (99).

Los neurotransmisores adrenérgicos son catecolaminas. Con este nombre se designa a un grupo de sustancias que contienen un núcleo catecol y un grupo amino en su composición y comprenden la dihidroxifeniletilamina (dopamina) y sus metabolitos, la noradrenalina y la adrenalina.

La dopamina es un importante neurotransmisor del sistema extrapiramidal y probablemente del mesolímbico. La adrenalina es la principal hormona de la medula suprarrenal, mientras que la noradrenalina predomina en las terminaciones adrenérgicas de los demás tejidos periféricos.



La **noradrenalina** se genera localmente en las neuronas que la utilizan. Esta y la adrenalina también se sintetizan en los tejidos cromafines. La biosíntesis se inicia a partir de la tirosina, que es captada desde el torrente sanguíneo por la célula nerviosa y sometida a una serie de migraciones en su interior que van desde el citoplasma hacia las mitocondrias, de nuevo al citoplasma y por último a una organela subcelular especializada, la **vesícula granulada** o **gránulo cromafínico**. En cada sitio se produce una transformación enzimática específica que conduce a la producción de noradrenalina de la siguiente manera:

**1°.- En la mitocondria:**

La L-tirosina se convierte en L-dihidroxifenilalanina (DOPA) por medio de la tirosina hidroxilasa.

**2°.- En el citoplasma:**

La L-dopa es decarboxilada por la L-dopa decarboxilasa y se forma dopamina.

**3°.- En el gránulo cromafínico:**

Se produce la hidroxilación de la dopamina, formándose noradrenalina. Esta reacción es catalizada por la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa.

En las células cromafines, además, se produce una migración intracelular adicional de noradrenalina, desde el gránulo cromafínico hacia el citoplasma, donde ocurre una N-metilación por medio de la feniletanolamina-N-metiltransferasa, volviendo luego al gránulo cromafínico para depositarse.

Después de su síntesis las catecolaminas se almacenan en las vesículas o gránulos sinápticos, donde quedan inactivadas y protegidas de su degradación. Allí se asocian a ATP y a una proteína llamada **cromogranina A**, formando un complejo denominado **fuentes de reserva intragranular**. Esta se mantiene en equilibrio activo con otras dos mas pequeñas, una fuente inmóvil intragranular y una fuente móvil citoplasmática.

Los conocimientos actuales en torno a como se produce la liberación de catecolaminas proceden de los estudios efectuados en la medula suprarrenal. Los acontecimientos se desarrollan de la siguiente manera. Ante la llegada del impulso por las fibras preganglionares (espláncnicas) se libera acetilcolina y se despolariza la membrana plasmática de las células cromafines. Se produce también una entrada de iones calcio que promueve la fusión de las membranas limitantes y las granulares, dando lugar a la descarga de catecolaminas hacia el exterior de la célula. Con esto desaparece la acetilcolina por difusión o hidrólisis y se libera el calcio que ha penetrado en la célula.

En las terminaciones nerviosas adrenérgicas, el calcio parece jugar un destacado papel en el proceso de acoplamiento del impulso nervioso con la liberación de noradrenalina. Así mismo se ha dicho que la acetilcolina liberada constituye un paso esencial, facilitador, en la secuencia de la liberación neuronal de noradrenalina.

Las catecolaminas son degradadas metabólicamente por la monoaminoxidasa (MAO) y la catecol-O-metiltransferasa (COMT). Sobre los productos que se generan actúan otras dos enzimas, una aldehído-deshidrogenasa y una aldehído-reductasa. La MAO se encuentra sobre todo en la membrana externa de las mitocondrias y participa en la regulación intraneuronal de los niveles de neurotransmisor libre. Toda la noradrenalina que cae en el axoplasma, desde los gránulos de almacenamiento, es catabolizada para formar productos fisiológicamente inactivos. La COMT convierte la noradrenalina y adrenalina en las correspondientes 3-O-metilaminas, la normetanefrina y metanefrina. Se encuentra sobre todo en hígado y riñón, y su localización dentro de la célula es imprecisa, pero se cree que está presente sobre todo fuera de la neurona adrenérgica, mientras que la MAO es una enzima intraneuronal.

La **acetilcolina** se considera como la sustancia neurotransmisora por excelencia. Actualmente está comprobado su papel neurotransmisor en las neuronas que dan lugar a las tres categorías de fibras periféricas (parasimpáticas postganglionares, autónomas preganglionares y motoras somáticas) (98).

La acetilcolina se sintetiza gracias a la combinación de la colina y el acetilcoenzima A (acetil-CoA), reacción que es catalizada por la enzima colina-O-acetiltransferasa (ChAc). Este proceso se lleva a cabo en el exoplasma y, de una forma mas activa, en la terminal nerviosa, donde la ChAc presenta la concentración más elevada. La colina es captada del líquido extraneuronal por un mecanismo activo y, después de la liberación neuronal en la hendidura sináptica y de la consiguiente hidrólisis de la acetilcolina, entre el 35 y el 50% de la colina liberada es captada de nuevo por la terminal presináptica y reutilizada para la nueva síntesis de acetilcolina.

Parece que existen diferentes depósitos de acetilcolina en las porciones citoplásmicas vesicular y extravesicular de las neuronas colinérgicas (100). Tras la estimulación nerviosa fisiológica, el contenido de acetilcolina de las terminales nerviosas permanece constante, aun cuando se liberen cantidades apreciables de la misma. Se han distinguido dos depósitos de acetilcolina, uno liberable a través de la estimulación nerviosa, y otro estable que no lo es. Quizás ambos son intercambiables. A su vez, el depósito de acetilcolina liberable se subdivide en una pequeña fracción inmediatamente disponible (15-20%) y una gran fracción de depósito, de movilización más lenta. Esta última se situaría en las vesículas de almacenamiento adyacentes a la membrana terminal. Además, existe otro depósito denominado excedente de acetilcolina, que es intracelular y que no la libera por la llegada del impulso nervioso, sino por despolarización ocasionada por el potasio. Es útil, especialmente durante las estimulaciones nerviosas prolongadas, para mantener mejor la presencia de acetilcolina en la terminación nerviosa.

Al llegar el impulso nervioso la acetilcolina se libera en paquetes uniformes, denominados quanta, que equivalen al contenido de una vesícula de almacenamiento. Una vez liberada en la hendidura sináptica es sometida a la acción hidrolítica de la acetilcolinesterasa (AChE), que se encuentra en las uniones neuromusculares.

Tras la liberación neuronal, los transmisores adrenérgicos y colinérgicos activan las membranas postsinápticas de los cuatro tipos de células efectoras: las del músculo liso, las células del músculo cardíaco y/o las células glandulares nerviosas y exocrinas. Estas células están dotadas

de receptores que poseen, en un punto, la configuración estérica complementaria al transmisor en cuestión. La combinación del transmisor liberado con el sitio complementario de recepción inicia una serie de reacciones en cadena que culminan en la respuesta biológica observable.

Los **receptores adrenérgicos** se clasifican en receptores  $\alpha$  y  $\beta$ . Los primeros se bloquean por la dibencilcloretamina (Dibenamine) y la fenoxibenzamina y sustancias similares, mientras que los segundos son bloqueados por agentes como el dicloroisoproterenol y el propranolol. La noradrenalina actúa fundamentalmente sobre los receptores  $\alpha$ , el isoproterenol sobre los  $\beta$  y la adrenalina sobre ambos.

A su vez, dentro de los receptores  $\beta$  existen dos subtipos, los  $\beta_1$  y los  $\beta_2$ . Los primeros se encuentran en tejido adiposo y corazón. Poseen una afinidad relativamente alta por la noradrenalina, muy similar a la tienen por la adrenalina y solo una tercera o cuarta parte de afinidad por el isoproterenol. En el tejido adiposo los receptores  $\beta_1$  aumentan la lipólisis, mientras que en el corazón aceleran el ritmo cardíaco, la contractilidad y velocidad de conducción. El practolol es un antagonista selectivo para estos receptores. Los  $\beta_2$  se encuentran en el músculo liso vascular, bronquial y uterino, donde actúan relajándolo. También intervienen en los efectos metabólicos que las catecolaminas ejercen sobre el músculo esquelético y en el hígado. Estos receptores  $\beta_2$  tienen una afinidad mucho más alta por el isoproterenol que por la noradrenalina. La butoxamina es un antagonista  $\beta$ -adrenérgico relativamente selectivo para este tipo.

Los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$  parecen ser polipéptidos de similar peso molecular (62.000-67.000 daltons), pero su composición polipeptídica no es idéntica. Los dos se encuentran acoplados a la adenilciclase en la membrana celular. Un componente regulador importante del sistema adenilciclase es la **proteína reguladora del nucleótido de guanina (Ns)**, un heterodímero o heterotrímero compuesto de una subunidad de 40.000-45.000 daltons, que se denomina  $\alpha$ -s, otra de 35.000 daltons que se llama subunidad  $\beta$  y quizás otra, de 5.000 a 10.000 daltons llamada  $\gamma$ . Cuando el agonista se asocia a su receptor  $\beta$ , se produce una unión de alta afinidad entre el complejo agonista-receptor y la Ns. Esta última se activa y se separa en las subunidades  $\alpha$ -s y  $\beta$ , por un mecanismo

aún no bien conocido. La subunidad  $\alpha$ -s activa a la adenilciclase y esta última, en presencia de iones magnesio, cataliza la formación de nucleótido cíclico, adenosin 3',5'-monofosfato (AMPc) y pirofosfato, a partir de ATP. El AMPc actúa como un segundo mensajero de la acción catecolaminica, modificando la actividad de la enzima y las barreras de permeabilidad, lo que se realiza a través de otra enzima denominada **proteinkinasa** de la que se han identificado dos tipos (I y II). Parece que ambos son tetrámeros compuestos por dos subunidades reguladoras y dos subunidades catalíticas (101). El AMPc se une a las subunidades reguladoras produciendo su disociación y permitiendo que las subunidades catalíticas realicen su función, que es la fosforilación de las proteínas del sustrato endógeno. Estas fosforilaciones ponen en marcha una cascada de reacciones bioquímicas que conducen a una serie de reacciones metabólicas, genéticas, electroquímicas y mecánicas reguladas por el AMPc. Así, en el músculo liso se produce un secuestro del calcio en la célula o un aumento de su salida. Cuando cae la concentración de AMPc se recombinan las subunidades de la enzima reguladora con las subunidades catalíticas, inactivándose de esa manera la proteinkinasa.

La regulación de la concentración intracelular del AMPc es una función que la adenilciclase comparte con una o más adenosin cíclico-3',5'-monofosfato fosfodiesterasas específicas, hidrolizando la unión 3'-fosfato éster del AMPc para llegar al 5'-AMP. Es posible que la actividad de las fosfodiesterasas en la célula pueda estar modulada por sustancias como el calcio, la calmodulina y la insulina.

Una teoría que se ha barajado ampliamente, para explicar la fisiopatogenia del asma, es que los receptores  $\beta$ -adrenérgicos fueran anómalos (102). Esta posibilidad no ha podido ser probada de forma incuestionable y probablemente los defectos que se han observado hayan sido secundarios a la propia enfermedad, quizás como resultado de la inflamación de la vía aérea o del empleo de una terapia con  $\beta$ -adrenérgicos. Por ejemplo, se sabe que cuando se administra este tipo de fármacos durante un tiempo disminuye su efecto, bien porque exista un defecto en el acoplamiento con el receptor o alguna anomalía en la cascada bioquímica que conduce a la relajación. Es posible que la inflamación pudiera inducir tales anomalías funcionales en los  $\beta$ -receptores. Se ha visto que la

estimulación de la hidrólisis de la fosfoinositida puede llevar a la disminución y al desacoplamiento de los  $\beta$ -receptores del músculo liso de la vía aérea, probablemente por la activación de la proteína-C kinasa en respuesta al diacilglicerol generado por la hidrólisis del fosfatidil-inositol. Como muchos mediadores inflamatorios y espasmógenos pueden estimular la hidrólisis del fosfatidil-inositol, es posible que ello propicie un mecanismo de alteración de la función de los  $\beta$ -receptores en el asma.

En cuanto a los receptores  $\alpha$  también se distinguen dos tipos. Los  $\alpha_1$  se han asimilado con los clásicos receptores  $\alpha$ , mientras que los  $\alpha_2$  se sitúan en las terminaciones nerviosas adrenérgicas postganglionares, donde inhiben la liberación del neurotransmisor, así como en los receptores efectores del cerebro, útero, glándula parotídea y algunas áreas del músculo liso vascular (101).

Se sabe poco acerca de su mecanismo de actuación. Parece que las catecolaminas combinadas con los receptores  $\alpha_2$  actúan reduciendo los niveles endógenos de AMPc. Esto sucedería por la interacción del complejo receptor agonista con otro componente de la membrana, Ni, que parece análogo a Ns, ya que es un heterodímero o heterotrímero que presenta una subunidad mayor  $\alpha_1$ , de 41.000 daltons de peso molecular, y que se activa por la unión al GTP. No está claro si después actúa inhibiendo directamente la adenilciclase o la función Ns para activar dicho enzima (103). Cuando se estimulan los receptores  $\alpha_1$  aumenta la concentración citosólica del calcio y parece que este incremento propicia la activación del receptor  $\alpha_1$  en los diversos tejidos donde ejerce su acción. Por ejemplo, el calcio activa la kinasa de cadenas ligeras de miosina dependiente de la calmodulina en el músculo liso, y la fosforilación de la miosina por esta kinasa se asocia a su vez con el desarrollo de la tensión contractil.

La contracción mediada por los receptores  $\alpha$  solo puede demostrarse en determinadas condiciones. En estudios efectuados con tráqueas caninas, tanto in vitro como in vivo, se ha observado que la histamina y la serotonina facilitan la broncoconstricción  $\alpha$ -adrenérgica, efecto que no es debido a la modificación de la densidad o de la afinidad del receptor  $\alpha$  (104). Esto no se ha observado en el hombre. Si el efecto  $\alpha$ -adrenérgico fuera importante en el asma, los medicamentos  $\alpha$ -bloqueantes deberían ser beneficiosos, lo que no se ha comprobado (105).

Los **receptores colinérgicos** están peor estudiados que los adrenérgicos. En base a la actuación de ciertos agentes bloqueantes sobre ellos, se distinguen dos clases:

**1º.- Receptor muscarínico:**

Son los receptores más importantes a nivel de la transmisión gangliónica y de la respuesta final en el órgano (106). Sensibles a la atropina, estos receptores muestran una distribución en el pulmón que coincide con la de las fibras nerviosas colinérgicas, predominando en las vías centrales y siendo menos abundantes en la periferia (107). La unidad funcional del receptor muscarínico parece estar compuesta por una sola subunidad de proteína de un peso molecular aproximado de 80.000 daltons. Existen cinco subtipos de receptores muscarínicos ( $M_1$  a  $M_5$ ). La interacción de agonistas con los receptores  $M_1$ ,  $M_3$  y  $M_5$  aumenta el recambio del fosfatidilinositol, mientras que con los receptores  $M_2$  y  $M_4$  causa la inhibición de la adenilciclase y reduce la producción de AMPc (108). Los receptores  $M_1$ ,  $M_2$  y  $M_3$  se han asociado con el músculo liso bronquial, y su activación ejercería una acción broncoconstrictora (109)

**2º.- Receptor nicotínico:**

Es un receptor bien caracterizado, compuesto por cuatro subunidades de glucoproteínas denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ . El receptor intacto está compuesto por dos subunidades  $\alpha$ , una  $\beta$ , una  $\gamma$  y una  $\delta$ . Se encuentran dispuestas alrededor de un canal central utilizado para el paso de cationes. Su apertura se produce cuando se unen dos moléculas de acetilcolina, una a cada subunidad  $\alpha$ . Dentro de este tipo de receptor se distinguen dos subtipos. El  $N_1$  es sensible al tetraetilamonio y se encuentra en las uniones sinápticas (110). El  $N_2$  se muestra sensible al curare y predomina en las uniones del músculo estriado.

Los nervios colinérgicos constituyen la principal vía broncoconstrictora del aparato respiratorio humano, por lo que han sido estudiados a fondo, intentando desentrañar los mecanismos íntimos que conducen a la aparición del asma (111). Existen varios caminos por los que se puede inducir un aumento de la actividad colinérgica. En primer lugar la conducción vagal central podría estar aumentada en el asma, aunque no se ha encontrado ninguna evidencia al respecto. Sí

hay pruebas indirectas de que existe un aumento del tono vagal, como es el incremento del tono cardíaco vagal que se ha demostrado en los pacientes asmáticos (112). Además, puede haber un aumento del reflejo de broncoconstricción debido a una estimulación de los receptores sensitivos de las vías aéreas por mediadores inflamatorios. Varios de estos mediadores, como la histamina, las prostaglandinas y la bradikinina, se ha visto que estimulan a los receptores sensitivos y es posible que este hecho se efectúe mas fácilmente en el asma, al estar lesionado el epitelio de las vías aéreas. Así mismo puede haber un aumento de la neurotransmisión en los ganglios colinérgicos, quizás como consecuencia de la liberación de otros neurotransmisores o mediadores o por la facilitación de la liberación de acetilcolina por los nervios terminales postganglionares. Por ejemplo, la serotonina y los análogos del tromboxano posibilitan la liberación de acetilcolina en las vías aéreas de perros, teniendo similar acción las taquikininas en las vías aéreas de cobayas y conejos. Como los nervios adrenérgicos pueden inhibir la liberación de acetilcolina, o por la vía de los  $\beta$ -receptores o por la de los  $\alpha_2$ , es posible que un defecto de los nervios adrenérgicos pueda manifestarse por un aumento del tono colinérgico.

Los pacientes asmáticos presentan una respuesta broncoconstrictora exagerada a los agonistas colinérgicos (113). Esto se produciría por un incremento de la densidad de los receptores o de su afinidad. Como también se observa un aumento similar de la reactividad con otras sustancias como la histamina, los leucotrienos o las prostaglandinas, es poco probable que exista un defecto aislado de los receptores muscarínicos.

Aunque hay varias razones que apoyan la teoría de una exaltación del sistema colinérgico para explicar el asma, nos encontramos con que los antagonistas colinérgicos utilizados terapéuticamente en el hombre suelen ser menos efectivos que los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos. Esto implica la existencia de otros mecanismos distintos al tono vagal que contraigan también al músculo liso bronquial. Presumiblemente varios mediadores puedan actuar directamente sobre dicho músculo. Por ejemplo, la histamina produce un efecto broncoconstrictor que no se inhibe con fármacos anticolinérgicos en el hombre, aunque si en el perro al que se le ha seccionado el vago o se ha tratado con atropina.



Se ha demostrado la presencia de receptores muscarínicos inhibitorios (autorreceptores) en los nervios colinérgicos de la vía aérea, tanto en animales como en el hombre (114). Estos receptores inhiben la liberación de acetilcolina y, por tanto, limitan la broncoconstricción vagal. Medicamentos como la atropina, que bloquea con igual afinidad los receptores presinápticos y los del músculo liso, incrementan la liberación de acetilcolina para superar el bloqueo postsináptico. Esto significa que tales medicamentos no serían tan efectivos contra la broncoconstricción vagal. Se ha demostrado la presencia in vivo de autorreceptores muscarínicos en el hombre. Un agonista colinérgico que active selectivamente a estos receptores inhibe la broncoconstricción colinérgica en individuos normales. Este mecanismo inhibitorio no parece ser efectivo en los asmáticos, lo que sugiere la posibilidad de que exista alguna alteración en la función de estos autorreceptores muscarínicos (115). Tal defecto puede dar lugar a reflejos colinérgicos exagerados, porque puede haberse perdido el mecanismo normal de retroalimentación inhibitoria de la liberación de acetilcolina. Esto podría explicar también la broncoconstricción que ocurre en el asma con los  $\beta$ -bloqueantes, puesto que el antagonismo de los  $\beta$ -receptores inhibitorios en los nervios colinérgicos podría dar lugar a un incremento de la liberación de acetilcolina que no podría detenerse por sí sola.

Por último, se ha observado en diferentes tejidos, principalmente en el intestino, que se producen respuestas que no pueden atribuirse a la activación de los sistemas adrenérgico o colinérgico antes mencionados. Estas respuestas se deben a la estimulación de un sistema de inervación específico que ha recibido el nombre de **Sistema no Adrenérgico no Colinérgico** (Non-Adrenergic Non-Cholinergic nerve supply, NANC). La estimulación de las fibras NANC en el aparato respiratorio da lugar a la relajación del músculo liso bronquial, aunque en algunos animales de experimentación, como el cobaya, se han descrito patrones de broncoconstricción (108).

Inicialmente se creyó que el neurotransmisor del NANC era la **adenosina**, que es un nucleótido de purina que se forma durante el metabolismo del ATP, o bien el propio ATP. Posteriormente se ha comprobado que, en el hombre, la adenosina ejerce una acción contráctil sobre el músculo liso y no relajante como se había pensado (116). Incluso se ha visto que la inhalación de adenosina, por parte de sujetos asmáticos, causa broncoconstricción (117). También

se ha demostrado que la adenosina es un potente y rápido estimulante de la secreción de las vías aéreas y que esta acción, así como la broncoconstricción, puede inhibirse con concentraciones terapéuticas de teofilina. Tras la provocación antigénica se encuentra un aumento bifásico de la concentración de adenosina en plasma, mientras que tras la provocación bronquial con metacolina aparece un solo pico (118). El aumento inicial de adenosina en plasma, tras la provocación antigénica, se ha atribuido a la activación de los mastocitos, tras la unión antígeno-IgE específica, y posterior liberación de adenosina (119). A su vez, la adenosina estimula la liberación de mediadores preformados en el mastocito (120). En resumen, parece que la broncoconstricción inducida por la adenosina se origina a partir de la estimulación de los receptores de adenosina presentes en las terminaciones de los nervios vagales postganglionares y en los mastocitos. El sinergismo entre la acetilcolina liberada y los mediadores mastocitarios es lo que causa la broncoconstricción. La adenosina liberada de los mastocitos puede, a su vez, incrementar la liberación de mediadores de otros mastocitos.

Los estudios mas recientes señalan que, tanto el **péptido intestinal vasoactivo** (Vasoactive Intestinal Polypeptide, VIP) como el **péptido histidina isoleucina** (Peptide Histidine Isoleucine, PHI) podrían actuar como neurotransmisores del NANC. El VIP es un péptido compuesto de 28 aminoácidos que ha sido localizado, por técnicas inmunohistoquímicas y con radioligandos, en los nervios y ganglios que inervan la vía aérea, especialmente del tracto aéreo superior (121). También se han visto fibras nerviosas inmunoreactivas a VIP dentro del músculo liso de la vía aérea, en las paredes de los vasos pulmonares y bronquiales y en el entorno de las glándulas submucosas de la pared traqueobronquial. Sus efectos farmacológicos conocidos comprenden la relajación del músculo liso, la vasodilatación y la estimulación de la secreción de las glándulas exocrinas.

En cuanto al PHI está formado por 27 aminoácidos y es bastante parecido al VIP, habiéndose observado una distribución similar a éste en los animales. También se ha comprobado una acción relajante sobre el músculo liso (122). En el hombre se ha postulado que un péptido relacionado, el **péptido histidina metionina** (Peptide Histidine Metionine, PHM) sería el equivalente al PHI (123).

Además de los neurotransmisores antes referidos existen otras sustancias que actúan a través del NANC. Entre ellas se encuentra la **sustancia P**, que es un decapeptido ampliamente distribuido por el sistema nervioso central y periférico. Se han aislado varias moléculas similares en diferentes especies animales. Todas ellas han recibido el nombre genérico de **taquikininas** porque contraen rápidamente el músculo liso. En la vía aérea humana se han identificado 3 taquikininas: la sustancia P propiamente dicha, la sustancia K (o neurokinina A) y el neuropéptido K (124). Se han encontrado fibras nerviosas conteniendo estas taquikininas por debajo o en el interior del epitelio de la vía aérea, rodeando a los vasos sanguíneos y a las glándulas submucosas, dentro del músculo liso bronquial y en el entorno de células ganglionares traqueobronquiales. También se han observado alrededor de bronquios, bronquiolos y vías aéreas mas distales, extendiéndose ocasionalmente al interior de los alvéolos (125). Sus principales efectos farmacológicos son la dilatación del músculo liso vascular y la constricción del músculo liso de la vía aérea (126). Así mismo estimulan la secreción de las glándulas exocrinas, aumentan la permeabilidad microvascular y liberan histamina de los mastocitos. Las taquikininas se degradan por la acción de una encefalinasa endógena (metaloendopeptidasa neutra) que se encuentra en las membranas celulares de las glándulas mucosas de las vías aéreas, epitelio, músculo liso y nervios, pudiendo tener, por tanto, un importante papel regulador de la función de los neuropéptidos, tanto en individuos sanos como en asmáticos (127). Una respuesta inflamatoria que disminuyera la acción de la endoencefalinasas ampliaría la respuesta a estímulos que liberan taquikininas (97).

Otra sustancia relacionada con el NANC es el **péptido relacionado con el gen de la calcitonina** (Calcitonin Gene-Related Peptide, CGRP) que contiene 37 aminoácidos y se deriva del mismo gen que la calcitonina (128). Se encuentra en las mismas fibras nerviosas que las taquikininas y sus acciones farmacológicas incluyen la contracción del músculo liso de la vía aérea y la relajación del músculo liso vascular (129). La coexistencia del CGRP y de la sustancia P, así como el hallazgo de que la primera es un potente inhibidor de la degradación de la segunda, sugiere que el CGRP actúa modulando la acción de la sustancia P (130).

La **bombesina** es un tetradecapéptido aislado en la piel de rana que se ha visto que ejerce potentes acciones biológicas en los mamíferos, tales como la liberación de gastrina y otras hormonas intestinales, la estimulación del páncreas exocrino y la contracción del músculo liso. Actúa como un potente broncoconstrictor en cobayas anestesiados. Por otra parte se ha aislado el **péptido liberador de gastrina** (Gastrin Releasing Peptide, GRP), observándose una similitud estructural y de actuación biológica con la bombesina, habiéndose llegado a considerar que se trata de la sustancia equivalente de esta última en los mamíferos (131). Se ha constatado la presencia de fibras nerviosas inmunorreactivas al GRP, especialmente alrededor de los vasos sanguíneos y de las glándulas seromucosas. También se han visto fibras sueltas en el músculo liso y en la pared traqueal (132).

El **neuropéptido Y** (Neuropeptide Y, NPY) está constituido por 36 aminoácidos. Coexiste junto con la noradrenalina en las fibras nerviosas simpáticas de varias áreas vasculares, habiéndose detectado, mediante técnicas inmunorreactivas, en la adventicia de los vasos sanguíneos y en el músculo liso (133). El NPY tiene una acción vasoconstrictora y regula los efectos neurales adrenérgicos (134), aunque su papel real en la modulación del tono de la vía aérea aún está por determinar.

La **galanina** es otro péptido de 29 aminoácidos que se ha detectado en fibras nerviosas del músculo liso de la tráquea y bronquios principales. También se han visto fibras nerviosas positivas para la galanina alrededor de las glándulas seromucosas y en la adventicia de los vasos sanguíneos (135). En la actualidad se ignora su función.

Otros péptidos detectados en el pulmón, y cuya misión se ignora por el momento, son la **calcitonina** y la **leu-enkefalina** (136).

Pese a que los neurotransmisores del sistema NANC no han sido totalmente identificados y no se disponga de adecuadas sustancias bloqueadoras específicas, al ser el sistema NANC la única vía nerviosa broncodilatadora conocida en el aparato respiratorio humano, se ha teorizado sobre la existencia de alguna alteración en el mismo que explicara el asma. Esta podría tener su origen en un

defecto intrínseco de estos nervios, cosa que parece improbable, o deberse a una anomalía secundaria, como el aumento o degradación del neurotransmisor correspondiente. Las células inflamatorias liberan una variedad de peptidasas que pueden determinar la degradación mas rápida del VIP en las vías aéreas de los sujetos asmáticos. Como el VIP actúa normalmente en la vía aérea como un mecanismo de freno, podría propiciarse una broncoconstricción exagerada (137). Pero quizás sea mas probable la existencia de un aumento de la actividad de los nervios excitatorios del sistema NANC. Según los estudios realizados en animales, la broncoconstricción NANC es debida a la liberación de neuropéptidos, como la sustancia P y la neurokinina A, por las terminaciones nerviosas sensoriales de las fibras C. Si estas terminaciones sensoriales son activadas en el asma, por la exposición de las terminaciones nerviosas epiteliales, y se liberan mediadores, como bradiquinina y prostaglandinas, se puede poner en marcha un reflejo axónico. La liberación de neuropéptidos sensoriales podría entonces iniciar la broncoconstricción, la hiperemia, la transudación microvascular y la hipersecreción de moco. Tales reflejos locales ampliarían y diseminarian la inflamación en la vía aérea. No hay antagonistas adecuados para los receptores de las taquikinas, de modo que es difícil asegurar cual es el papel que los reflejos axónicos juegan en el asma. Sin embargo, se ha visto que la liberación de neuropéptidos sensoriales puede modularse por receptores opioides, tanto in vitro como in vivo (138). Como los nervios selectivos están presentes y los neuropéptidos sensoriales tienen potentes efectos sobre la vía aérea humana, parece probable que la inflamación neurogénica pueda ocupar un papel primordial en el asma.

En resumen, la broncoconstricción es un complejo proceso mecánico que puede estar causado por mediadores neurales y químicos. Para avanzar en su conocimiento es esencial conocer los procesos neurofisiológicos y bioquímicos implicados, así como las células que pueden liberar mediadores, las sustancias que actúan como quimiotácticas y los efectos bioquímicos y mecánicos que van a ocasionar todos ellos.

### **I.3.- POLINOSIS**

La polinosis, o alergia al polen, es una enfermedad que clínicamente se caracteriza por aparecer en una época determinada del año, estando el sujeto libre de síntomas el resto del tiempo. Puede manifestarse de tres formas:

#### **1.- Rinoconjuntivitis polínica:**

También llamada fiebre del heno o coriza espasmódico. Es el cuadro mas frecuente. La rinitis se caracteriza por crisis de al menos cinco estornudos, hipersecreción mucosa o seromucosa, obstrucción nasal por edema de la mucosa, y prurito nasal. En la conjuntivitis destaca la inyección conjuntival, prurito, lagrimeo, fotofobia y, a veces, edema palpebral. Casi todos los pacientes presentan manifestaciones mixtas en mayor o menor medida. El cuadro puede acompañarse de epistaxis, anosmia, otitis serosa e incluso hipoacusia por obstrucción de la trompa de Eustaquio secundaria al edema de la mucosa de la nasofaringe. También pueden manifestar prurito en la faringe, en el velo del paladar o en el conducto auditivo externo.

#### **2.- Asma:**

No tiene especiales características y suele acompañarse de sintomatología rinoconjuntival.

#### **3º - Urticaria y angioedema:**

Es una forma clínica que se presenta pocas veces de forma aislada, pero sí acompañando a los otros cuadros. Incluso puede ser la primera manifestación de la enfermedad.

Otros problemas asociados, que presentan algunos sujetos, son alergia a ciertos alimentos, especialmente frutas y la astenia, sobre todo al comienzo de la primavera.

La polinosis no solo es importante por el número de pacientes que están afectados en todas las áreas del mundo, sino también porque incapacita periódicamente a los sujetos afectos, causando

absentismo laboral, faltas escolares y bajo rendimiento de los alumnos, justamente en una época docente clave como es la primavera. Así mismo se generan unos gastos sanitarios (medicación antihistamínica, broncodilatadora y hospitalización) nada desdeñables.

### **I.3.1.- Historia**

Ya en el siglo XIX se estableció la relación entre la enfermedad y la aparición en el ambiente de ciertos pólenes. En 1819 un médico inglés, Bostock, describió por vez primera el cuadro clínico correspondiente a la fiebre del heno, al observar la coincidencia de sus síntomas, él era polínico, con el tiempo de floración de las praderas. Unos años después, en 1873, otro médico compatriota suyo, Blackley, que también era polínico, observó la aparición de una pápula con eritema alrededor tras realizar en su piel una escarificación y depositar restos de polen de gramíneas sobre la misma.

Los pólenes se encuentran entre los alérgenos que antes se identificaron como tales y hoy en día todavía constituyen el grupo de neumoaérgenos menos discutido como agentes causales de patología alérgica.

### **I.3.2.- Frecuencia**

La polinosis es una enfermedad frecuente en todo el mundo. La tercera parte de las rinitis alérgicas son polínicas (130). En un estudio realizado en nuestro país por Gómez Carrasco y cols. (140) encontraron que la polinosis era el motivo de consulta en el 7.9% de los pacientes vistos en una policlínica de alergia infantil. En las consultas externas de la Sección de Neumología y Alergia Infantil de nuestro Hospital encontramos que la sensibilización al polen ocasiona el 95% de las rinitis estacionales y el 75% del asma extrínseco.

### **I.3.3.- Etiopatogenia**

Los granos de polen son esenciales para la reproducción de casi todas las plantas de semilla o espermatofitas. Este polen puede ser transportado por el aire (anemófilas) o por los insectos (entomófilas) y rara vez por pájaros o murciélagos.

Las plantas entomófilas tienen flores escasas, grandes, solitarias y llamativas, con pétalos coloreados, anteras prominentes y nectarias bien desarrolladas que atraen a los insectos. Producen escasa cantidad de polen, que en general no llega a pasar a la atmósfera por ser transportado por los insectos, por lo que su importancia como causantes de patología alérgica es escasa.

Por el contrario, las plantas anemófilas presentan nectarias y estructuras rudimentariamente coloreadas, o incluso inexistentes. Las flores son diminutas, de colores monótonos y suelen formar grandes racimos o **inflorescencias**. Sin embargo, la cantidad de polen producido por cada planta es importante. Una sola puede liberar millones de granos de polen, aunque no todo llegará a la atmósfera, ya que una parte cae dentro de un perímetro de varios metros en torno a la planta. Por ejemplo, se ha visto que solo el 5-10% de polen emitido por la *Ambrosia elatior* alcanza una aérea de dispersión apreciable. El transporte de polen se ve favorecido cuando las partículas alcanzan la región superficial del flujo de aire laminar que circunda a la superficie de las plantas, y pasan al estrato limitante superior de aire turbulento que posee un movimiento más rápido. Durante el transporte los niveles de polen van cayendo porque muchas partículas se van depositando por acción de la gravedad, porque impactan sobre superficies que sobresalen o porque son diluidas al ser atrapadas por corrientes convectivas verticales de aire o dispersadas por el viento. La lluvia ejerce una acción de arrastre aumentando su depósito en el suelo. Aún así, una minoría de partículas puede ser transportada a lo largo de centenares de kilómetros antes de depositarse.

Para que un determinado polen resulte alérgico han de coincidir las siguientes circunstancias:



1º.- Debe presentar grupos antigénicos específicos capaces de provocar respuestas reagínicas (IgE dependientes).

2º.- Deben de existir fuentes suficientemente importantes y mecanismos de transporte adecuados para que el individuo susceptible alcance niveles de exposición que le desencadenen los síntomas.

Estas premisas resultan difíciles de verificar, pues todavía no están bien estudiados los patrones de prevalencia y distribución de los aerosoles biológicos y tampoco se han evaluado, mediante pruebas directas, las respuestas alérgicas a muchas de estas partículas. Incluso en neumoalergenos claramente causantes de patología alérgica, aún no se ha establecido el umbral dosis-respuesta, siendo dudoso, en algunos casos, que la exposición natural a alguno de ellos sea suficiente como para causar síntomas. Los resultados obtenidos mediante test de provocación también resultan controvertidos, ya que las condiciones del laboratorio no se ajustan a lo observado de forma natural.

El grano de polen constituye el gametofito masculino de la planta, y se desarrolla a partir de células especializadas, tras una serie de divisiones meióticas y mitóticas que conducen a la formación de gametos capaces de fertilizar al óvulo, así como de material nuclear acompañante que contribuye a la formación del **endosperma**, una fuente nutricia para el embrión. Este proceso de formación tienen lugar en el interior de unas cavidades llamadas **sacos de las anteras**, que se localizan en las **anteras**. Estas se encuentran en el extremo de los **filamentos**. El conjunto de antera y filamento recibe el nombre de **estambre**. Los sacos de las anteras contienen un estrato de soporte o **tapetum** que produce un líquido que baña a los granos de polen en desarrollo e intercambia con ellos material metabólico y antigénico. Cuando los granos han alcanzado la madurez se desarrollan defectos en las paredes de los sacos y el polen queda expuesto al medio externo. Esta fase se llama **antesis**. Por medio del viento u otros agentes el polen es transportado hasta alcanzar un estigma receptivo. Una vez allí el grano emite un tubo revestido de protoplasto, a través de un orificio o una porción debilitada de su propia pared. Este tubo posee enzimas de superficie que lisan los tejidos

que obstaculizan su salida y facilitan su rápido crecimiento hacia abajo, a través del estigma y el estilo de la flor receptora, alcanzando el ovario y produciéndose la fertilización.

En los medios acuosos, donde habitualmente son observados, los granos de polen poseen un cuerpo casi esférico de 14-60  $\mu\text{m}$  de diámetro medio. Sin embargo, durante su transporte por el aire muchos se colapsan y adoptan formas irregulares propias de las condiciones de sequedad que tienen que soportar. En ellos se puede distinguir una cubierta externa llamada **exina**, que con frecuencia está esculpida y presenta aberturas en forma de poros circulares o surcos alargados. La exina está compuesta por **esporopolenina**, un polímero biogénico muy resistente. Debajo de la exina está la **intina** rica en celulosa y por último el **protoplasto**, que contiene el material genético, gránulos de almidón y otros organelos.

Dado el tamaño medio de los pólenes (entre 20 y 100  $\mu\text{m}$ ) es fácil comprender que entren en contacto con la superficie ocular y las vías aéreas superiores, quedando atrapadas en las mismas (141). Con granos de ambrosia marcados con isótopos se ha confirmado la ausencia de partículas inferiores a 18-20  $\mu\text{m}$  por debajo de la carina. Sin embargo, se sabe que las partículas inferiores a 5  $\mu\text{m}$  sí pasan fácilmente y quedan detenidas mas allá de los bronquiolos terminales. Se ha observado que el polen de ambrosia, aplicado a la nariz o inhalado por boca, no provoca obstrucción de la vía aérea en sujetos asmáticos, que sí responden a un aerosol de polen diluido (142). Por lo tanto deben considerarse otros mecanismos alternativos por los que el polen sea capaz de inducir una respuesta de broncoespasmo que no sea su propia presencia in situ. Entre las hipótesis que se han barajado están las siguientes:

1º.- El broncoespasmo se desencadenaría a partir de reflejos iniciados en los receptores nasofaríngeos, ante la presencia de polen.

2º.- Las partículas alergénicas serían absorbidas y puestas en contacto con el sistema inmunológico, sensibilizando al sujeto y dando lugar a la clínica de polinosis.

3º.- Exitirían fragmentos antigénicamente activos dentro del grano de polen.

Esta última teoría es la que tiene más probabilidades de acercarse a la realidad (43). Se ha postulado que estos antígenos estarían situados en el llamado **pollenkitt**, que se originan en la antera una vez que se ha formado el grano de polen, y se incorpora a la cubierta de exina del mismo. Está formado por pigmentos derivados de carotenos, flavonas, lípidos y algunas proteínas, incluyendo glicoproteínas. Estas serían antigénicamente activas y servirían para el reconocimiento, por parte del polen, del pistilo de la propia especie que debe fecundar. Este material antigénicamente activo puede quedar depositado en la misma planta o incluso en el humus del suelo y causar síntomas al contactar el individuo con la planta (urticaria del césped) o cuando se siega (estornudos) o al reflotar de nuevo en el aire por acción de la lluvia (144).

Desde hace años es posible realizar contajes de granos de polen en la atmósfera, siendo varios los métodos empleados (145). La presencia de 20 granos/m<sup>3</sup> de gramíneas se ha asociado con el desencadenamiento de síntomas clínicos en casi todos los individuos sensibles (145), mientras que para la ambrosia se ha establecido en 9 granos/m<sup>3</sup> (144). Sin embargo, lo más probable es que la dosis de polen necesaria para desencadenar síntomas en el individuo sensibilizado, varíe considerablemente de uno a otro. Se ha visto que los sujetos cuya mucosa nasal está expuesta diariamente al polen de ambrosia requieren dosis menores de dicho polen para que se reproduzcan los síntomas que cuando la misma prueba se realiza fuera de la estación polínica (146). Este efecto de **sensibilización** (priming) estaría conferido por partículas alergénicas contenidas en el polen. Ultimamente se han desarrollado técnicas inmunoquímicas que permiten la cuantificación de partículas antigénicas en la atmósfera y que aportarían más información sobre la correlación entre exposición y clínica (147).

Hay que tener en cuenta que otros factores como el grado de exposición corporal, la presencia de otros alérgenos o sustancias irritantes en la atmósfera y la infección respiratoria concomitante, modificarían los patrones de respuesta en el individuo polínico.

Los factores climáticos tienen una importancia decisiva en la producción de sintomatología estacional. En primer lugar, los años de sequía o de temperatura excesivamente baja limitan el

desarrollo de las plantas y se acompañan, en nuestro país, de malas cosechas cerealistas, siendo años favorables para estos pacientes.

Dentro de la propia estación polínica, los patrones circadianos de temperatura, humedad y velocidad del aire hacen que el polen se desprenda en ciertos momentos del día y no en otros (148). El aire en movimiento, seco y cálido, promueve la **antesis** en la mayoría de las especies anemófilas. Estas circunstancias suelen darse hacia el mediodía y en el periodo vespertino, aunque también pueden haber picos de emisión polínica durante las primeras horas de la mañana. Por ejemplo, la liberación y dispersión de polen de ambrosia se da 1-3 horas después de la salida del sol, sin embargo, los picos de recogida en las estaciones urbanas tiene lugar 2-4 horas después, correspondiendo esta diferencia al tiempo empleado en el transporte desde el campo a la ciudad.

La presencia del viento ayuda al transporte del polen en sentido horizontal e incluso puede aumentar el nivel de exposición al movilizar partículas previamente depositadas. La fuerza de viento mas favorable para aumentar la concentración de pólenes es la de 13-17 mph. Sin embargo, la llegada de vientos frescos produce corrientes ascendentes turbulentas que transportan las partículas polínicas a grandes altitudes dispersándolas.

En cuanto a la lluvia se sabe que, con los chubascos, se produce un descenso típico de aire frío que arrastra partículas hacia la superficie. Por otra parte, las gotas en las tormentas son muy gruesas y su capacidad de arrastrar partículas escasa, pero sí se muestran eficaces para reflotar partículas depositadas en la superficie cuando impactan con ellas. Estos hechos suceden sobre todo al principio, pudiendo traducirse por un claro empeoramiento de los síntomas en los pacientes. Si el tipo de lluvia que se produce es fino y prolongado, las pequeñas gotas arrastran las partículas suspendidas en el aire, disminuyendo su concentración en la atmósfera. Pero si aparece un cielo encapotado en una zona en la que existen cantidades apreciables de polen en suspensión a altitudes bajas y esta situación se produce a media mañana, en un día en que ya se ha producido la emisión de polen, puede quedar limitada la altura que alcancen las partículas y prolongarse su presencia en la superficie (145).

### I.3.4.- Pólenes de importancia alergológica

Ya hemos apuntado mas arriba que las plantas anemófilas son las únicas que emiten polen en suficiente cantidad para que lleguen a sensibilizar a los sujetos predispuestos. Con fines prácticos podemos dividir estas plantas en tres clases: árboles, malezas y gramíneas.

#### 1º.- Arboles:

El olivo es el mas importante de este grupo. Se extiende por toda la zona sudoeste de España y parte de la meseta. Posee un polen cuyo tamaño se sitúa entre 18-22  $\mu\text{m}$ , que es fácilmente transportable por el aire, habiéndose recogido granos de esta especie en ciudades situadas a mas de 70 kilómetros de distancia del olivar mas cercano. La **antesis** se produce en los meses de Mayo y Junio, a la vez que lo hacen las gramíneas. En Jaén se alcanzan recuentos de hasta 3.000 granos/ $\text{m}^3$ , mientras que en Madrid llegan a 200 granos/ $\text{m}^3$ . En las provincias mas olivareras es causa del 20% de las monosensibilizaciones. En Madrid se calcula que, cerca del 50% de los alérgicos a gramíneas, también presentan pruebas cutáneas positivas a polen de olivo, pero las monosensibilizaciones son escasas (149).

En cuanto al resto de árboles, en Madrid nos encontramos polen de olmo y de la familia Cupresaceae en Febrero, que se mantienen aún en Marzo. En este mes también existe polen de chopo (*Populus*) y de la familia Pinaceae (abeto, pino). En Abril, los pólenes predominantes pertenecen a la familia Quercus, especialmente la encina (*Q.ilex*), Pinaceae y plátano oriental (*Platanus orientalis*) (150). Ninguno de ellos parece tener importancia alergológica.

Hay que resaltar que los dos árboles ornamentales más frecuentes en Madrid, la robinia pseudoacacia y el plátano oriental, carecen de interés alergológico. La primera, el popular "pan y queso", porque es entomófila y su polen a penas se detecta en la atmósfera, pero al coincidir su floración con el pico de polinización de las gramíneas, el vulgo atribuye sus síntomas a su presencia. El segundo es el árbol más frecuente en Madrid. La polinización se produce durante 2 semanas del mes de Abril, llegándose a alcanzar recuentos de 2.000 granos/ $\text{m}^3$ . Sin embargo, el polen es

escasamente alergizante, pues solo el 1-2% de los polínicos muestra positividad en las pruebas cutáneas, desconociéndose casos de monosensibilización (145).

En el resto del país merece la pena destacar la presencia de abedul (*Betula verrucosa*), especialmente en la cordillera Cantábrica y montes de Galicia. En España florece en Abril, mientras que en Escandinavia lo hace entre Junio y Agosto. Es en ese enclave geográfico donde ocasiona la mitad de las polinosis.

## 2º.- Malezas:

En este grupo comprende una serie de plantas cuyos pólenes son causantes de patología alérgica.

Dentro de la familia Asteraceae se encuentra la ambrosía (*Ambrosia artemisiifolia* o *elator*), el ragweed de la literatura anglosajona, que es causa importante de polinosis en Estados Unidos, especialmente en la zona este. Poliniza desde finales del verano a principios de otoño. En Europa se ha descrito algún caso en las cercanías de bases americanas, habiéndose encontrado polen de dicha planta en las botas de los soldados que después germinaban en la tierra de la base.

También dentro de este grupo está la artemisa (*Artemisia absinthium* y *vulgare*), que florece de Julio a Septiembre y es la que más importancia tiene de esta familia para nosotros, especialmente en la zona levantina. En Madrid se alcanzan recuentos en Septiembre que a penas llegan al 1% del total, pero su capacidad sensibilizante es importante, siendo frecuente su positividad en las pruebas cutáneas.

En la familia Plantaginaceae, nos encontramos el llantén (*Plantago lanceolata*) que se da en toda España y en Madrid es frecuente observarlo en jardines y parterres. Su polinización coincide con la de las gramíneas y constituye, en esa época, el 4% de los recuentos totales, mientras que los test cutáneos son positivos en el 20-25% de los polínicos (145).

Por último, dentro de la familia Urticaceae, tenemos a la ortiga mayor (*Urtica dórica*), que poliniza en la primavera, alcanzando unos recuentos del 1% del total y cuya potencia alergizante es moderada, y a la parietaria (*Parietaria judaica*), de mayor importancia en la región levantina, donde incluso se han descrito casos de monosensibilización.

### 3º.- Gramíneas:

Se extienden por toda la tierra, constituyendo el 20% de la cubierta vegetal. De ellas se han descrito cerca de 10.000 especies y 650 géneros. A este grupo pertenecen toda una serie de plantas que sirven de alimento al hombre, como el trigo, la cebada, el maíz y el mijo. También están encuadradas en el mismo orden toda una serie de plantas que son la causa principal de la polinosis en todo el mundo. En Madrid en 100% de los pacientes tienen pruebas cutáneas positivas a gramíneas (150).

Una de las características de las gramíneas es la pequeñez y falta de vistosidad de sus órganos florales, consecuencia de su polinización anemófila que les hace independientes de los insectos, por lo que no requieren flores vistosas. La unidad floral es la **espiguilla** que contienen una o varias flores y está organizada en torno a un eje, generalmente articulado, que a veces se ve entre las flores y se denomina **raquilla**. En este eje se van insertando, en forma de hojitas minúsculas o escamas, la serie de piezas que forman cada una de las flores de la espiguilla. En la base se encuentran dos apéndices mas o menos aplanados, que se insertan, muy cerca uno de otro, en la raquilla y que reciben el nombre de **glumas**. Sobre ellas se encuentran una o varias flores alternando a uno y otro lado de la raquilla. La flor está formada por dos hojillas de naturaleza semejante a la de las glumas. La inferior y exterior se llama **lema** y suele ser mas grande que la superior e interior llamada **pálea**. Entre ambas se encuentran los órganos de reproducción. El ovario es una pequeña protuberancia globosa, a veces erizada de pelitos, y en su parte superior se encuentran unos apéndices en forma de plumeros, los **estigmas**, cuya misión es captar granos de polen, generalmente de otros individuos de la misma especie (polinización alogámica). En la base del ovario están los estambres, que normalmente son 3, compuestos de un **filamento** y una **antera** que presenta una hendidura longitudinal que separa los dos saquitos que la componen. En el momento de la floración

la lema y la pálea se entreabren por el empuje de los **lodículos**, una especie de globos hinchables situados en la base del ovario que se ingurgitan poco antes de producirse la antesis. De esa manera se posibilita la salida al exterior de las anteras colgadas de sus filamentos. Estos oscilan con el viento y desprenden el polen. Una vez concluida la operación las anteras se secan y se desprenden mientras que el ovario se fecunda, dilatándose y endureciéndose su cubierta externa dando lugar a la formación del grano o **cariópside** que terminará desprendiéndose y cayendo al suelo.

La mayoría de las gramíneas de Madrid son anuales, es decir, cada individuo vive solo una temporada, desde que se produce la germinación del grano hasta que madura un nuevo grano, muriendo entonces toda la planta excepto los propios granos que quedan en un estado de reposo o vida latente. La germinación suele tener lugar con las lluvias otoñales, la floración y polinización se produce en primavera. La maduración del grano ocurre a comienzos del verano. En climas más húmedos las especies suelen ser perennes, es decir, cada individuo dura varios años, aunque los tallos suelen caer también de forma anual.

El clima de Madrid es continental, caracterizándose por cambios bruscos de temperatura y una pluviosidad de unos 500 mm/año. Sin embargo a 60 Km se encuentra la Sierra de Guadarrama en la que la pluviosidad alcanza los 1170 mm/año. Esto trae como consecuencia que las gramíneas de tipo pratense, que necesitan alta pluviosidad, se den predominantemente en la sierra, mientras que en los alrededores de la capital pueden encontrarse plantas que se adaptan mejor al clima estepario-mediterráneo. Estas inician su floración a finales de Abril, alcanzándose recuentos de más de 50 granos/m<sup>3</sup> desde mediados de Mayo a finales de Junio. El pico máximo aparece en la 3ª y 4ª semanas de Mayo y primeros días de Junio (149). Hay que tener en cuenta que con los recuentos antes señalados la mayoría de los polínicos tienen síntomas, pero con cifras inferiores algunos ya presentan clínica. En Julio comienzan a florecer las gramíneas de la sierra. Como Madrid es una ciudad en la que predominan los vientos flojos y existe un 32% de calmas anuales, la cantidad de polen que llega a la capital es escasa. Sin embargo los pacientes pueden tener reactivación de sus síntomas si suben a la sierra.



En Madrid hay unas 180 especies de gramíneas. Siguiendo la nomenclatura de Tutin y cols. (151) y según González Bernáldez (152) en Madrid tenemos las siguientes gramíneas:

a. - Gramíneas de polen > 45  $\mu$ m

*Hordeum murium* (cebadilla, cebada bastarda)

*Bromus sterilis*.

Ambas comienzan a desarrollarse a finales de Febrero y son las responsables del verdor de los alrededores de Madrid al comienzo de la primavera. Polinizan en Abril. Como su polen es bastante grueso apenas se encuentra en el ambiente. Además el *Bromus* poliniza de forma autogámica.

b. - Gramíneas de polen entre 30-45  $\mu$ m

*Agrostis alba*

*Antoxanthum odoratum* (grama de olor)

*Cynodon dactylon* (grama de pie de gallina)

*Dactylis glomerata* (carcolillos)

*Festuca* (*F. pratensis*, cañuela)

*Holcus lanatus* (heno blanco)

*Lolium perenne* (ballico)

*Phleum pratense* (hierba timotea)

*Poa pratense*

El *Cynodon dactylon* precisa una humedad de tipo medio para su crecimiento, por lo que es posible encontrarlo en los alrededores esteparios de la capital, además de en la sierra. Crece bien a temperaturas mas altas que el resto de gramíneas, por lo que persiste en verano, cuando las demás se han agostado.

*Dactylis glomerata* se encuentra en céspedes plantados, taludes de carreteras y autopistas, cunetas etc. No suele darse bien en nuestro clima, pero sí la subespecie *D. glomerata* (jopillo) que, además de los lugares antes mencionados, crece en la sierra.

Todas las demás variedades precisan alta pluviosidad por lo que predominan en la sierra.

c.- Gramíneas de polen < 30 µm

*Koeleria phleoides*

*Poa annua*

*Polypogon*

*Trisetum paniceum*

*Koeleria phleoides* es poco abundante en los alrededores de Madrid y crece en caminos sombreados.

La *Poa annua* prospera en sitios húmedos y frescos, pero se adapta bien a las condiciones esteparias mediterráneas. Florece muy rápidamente, en cuanto hay una elevación térmica, por lo que es responsable de la sintomatología que presentan algunos polínicos en el mes de Febrero (veranillos locos).

*Polypogon* muy escaso en Madrid.

*Trisetum paniceum* es el más abundante en nuestra provincia, especialmente en las zonas este y sur. Se encuentra en los bordes de carreteras, cerca de los muros y en campos de cultivo.

Las capturas de pólenes realizadas en la capital a una altura de 20 metros, apenas contienen gramíneas de grano superior a 45 µm, encontrándose un 73% de granos de diámetro inferior a 32 µm (153).

Como hemos mencionado mas arriba, el polen de gramíneas es el responsable principal de la polinosis en nuestro país. Ello es debido al poder alergizante que posee y a la extensión que alcanzan. El 100% de los polínicos de nuestra aérea presentan pruebas cutáneas positivas a Dactylis, Lolium y Phleum. Todas las gramíneas pratenses presentan reactividad cruzada entre ellas, excepto Dactylis glomerata (154). Cualquiera de las primeras se utiliza como herramienta en el estudio y diagnóstico de los pacientes polínicos.

El Lolium es una de las gramíneas mejor estudiadas, desde el punto de vista alergológico. En él se han detectado los siguientes antígenos:

Lol p I (Rye I).....proteína ácida (Pm= 27.000)

Lol p II (Rye II)....proteína ácida (Pm= 11.000)

Lol p III (Rye III)..proteína básica (Pm= 11.000)

Existe un cuarto antígeno, Lol p IV, bastante lábil y que contribuye poco a la potencia alergizante total.

#### **I.4. DIAGNOSTICO DE LA HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL**

Se ignora cual es el estímulo más eficaz para identificar la HRB. Los métodos más empleados son la inhalación de histamina, metacolina (u otros agentes colinérgicos como la acetilcolina o el carbacol) o la prueba de esfuerzo. Existen otros como la hiperventilación isocápnica, o en ambiente frío y seco (155), o la inhalación de agua destilada (156), solución salina hipertónica (157), leucotrienos D<sub>4</sub> y C<sub>4</sub> (158), prostaglandinas F<sub>2α</sub> y D<sub>2</sub> (159), neurokinina A (160), adenosina (161), monofosfato de adenosina (162), propranolol (163), bradikina (164) y metoxamina (165).

Los diversos estímulos actúan a través de diferentes mecanismos específicos que son complejos e incompletamente conocidos. La respuesta broncoconstrictora puede desencadenarse:

a.- A partir de la estimulación directa de receptores situados en el músculo liso bronquial. Parece que esta situación se producía pocas veces.

b.- Acoplamiento con receptores situados en los mastocitos y macrófagos que conduzca a la liberación de mediadores que, a su vez, actúen sobre las células del músculo liso bronquial o sobre los receptores neurológicos.

c.- Estimulación de los receptores sensoriales nerviosos que induzca la producción de reflejos neuronales centrales, a través del vago, o reflejos axónicos locales.

Entre los estímulos más empleados tendríamos que la inhalación de metacolina parece actuar principalmente sobre el músculo liso bronquial, mientras que el ejercicio físico ejercería su acción de una forma indirecta, bien por mecanismos neurógenos o liberando mediadores (166).

#### **I.4.1.- Respuesta bronquial a la metacolina**

Entre los agentes parasimpaticomiméticos, empleados en las pruebas de provocación bronquial, están la acetilcolina, el carbachol y la metacolina. La primera tiene una utilidad clínica limitada, pues presenta un efecto muy fugaz debido a su metabolización por la colinesterasa. Los otros dos son bastante similares y quizás la disponibilidad de la segunda y la descripción de algún efecto secundario vagal por parte del primero han hecho que se haya divulgado más el empleo de la metacolina.

La metacolina (acetil-betametacolina) se presenta en forma de polvo blanquecino, altamente higroscópico. Para su empleo se disuelve en suero salino tamponado con fosfatos para alcanzar un pH de 7.2, a distintas concentraciones según el protocolo a emplear. A temperatura ambiente su poder se reduce un 10% después de 48 días y un 50% después de 10 meses, sin embargo, a 4°C y durante 4-6 meses solo pierde un 10% de potencia (167).

Se administra por vía inhalatoria comenzando a ejercer su acción inmediatamente, alcanzando el pico máximo a los dos minutos y desapareciendo a las dos horas (168). No hay respuesta dual y, a las dosis habituales, no se han observado efectos secundarios (169). Las únicas contraindicaciones absolutas para realizar el test sería la presencia de urticaria colinérgica y la hipersensibilidad a la metacolina, circunstancia esta última muy rara (170). Como contraindicaciones relativas están una función pulmonar afectada ( $FEV_1 < 20\%$ ), historia previa de urticaria o angioedema no filiados, cardiopatía severas o embarazo.

Actúa estimulando los receptores muscarínicos postganglionares del músculo liso bronquial, produciendo la contracción del mismo. Este efecto puede ser bloqueado con atropina, o con su análogo SCH1000, pero no con hexametonio (171). Las indicaciones para su empleo en la clínica habitual serían las siguientes:

1º.- Descartar la presencia de asma en sujetos que presentan tos, sensación de falta de aire, opresión torácica o historia dudosa de broncoespasmo (172).

2º.- Valoración inicial y seguimiento de los pacientes con asma ocupacional, una vez que se ha suprimido el agente causal (173).

3º.- Evaluación de fármacos que supuestamente disminuyen la hiperreactividad bronquial (174).

4º.- Investigar los mecanismos del asma.

La técnica de realización de la provocación bronquial se basa en administrar diluciones crecientes de metacolina hasta que la función pulmonar se afecte (caída de  $FEV_1 > 20\%$ ). De entre todos los parámetros respiratorios que pueden determinarse se ha escogido el volumen espiratorio forzado en el primer segundo porque, aunque en su primera parte el resultado depende del esfuerzo que realice el paciente y por tanto de su colaboración, en la segunda fase es independiente del mismo y ofrece una buena reproducibilidad.

Existen diversos métodos adecuados para realizar las pruebas de provocación bronquial. La dosis de aerosol que llega a las vías bajas del aparato respiratorio depende de las características del nebulizador, del patrón de inhalación y de la permeabilidad de la vía aérea:

**a.- Características del nebulizador:**

Se recomienda utilizar nebulizadores que produzcan partículas entre 1 y 5  $\mu\text{m}$  de diámetro aerodinámico de masa media (MMD), con los que se minimiza el depósito de las más grandes en boca, orofaringe y vías aéreas superiores, así como la pérdida de aerosol derivada de la exhalación de partículas de menos de 1  $\mu\text{m}$ .

**b.- Patrón respiratorio**

La distribución del aerosol en el interior de los pulmones está influida por el volumen y el flujo inspiratorio, el volumen pulmonar al comienzo de la inhalación del aerosol y el tiempo que el individuo mantiene la inspiración. La inhalación a volúmenes pulmonares altos o durante respiraciones profundas y lentas, aguantando la respiración al final del tiempo inspiratorio, aumenta el depósito de partículas en la periferia del pulmón, mientras que la respiración superficial y rápida facilita la sedimentación en las vías aéreas centrales (175).

Al comenzar la prueba hay que realizar una medición de la función respiratoria y tener constancia de que el sujeto presenta un  $FEV_1 > 20\%$ . A continuación, se administra un aerosol de la solución que emplearemos luego para realizar las diluciones sucesivas de metacolina, y se monitoriza de nuevo la función respiratoria, con objeto de descartar que el sujeto tenga una hiperreactividad tan intensa que solo por esta maniobra se produzca un broncoespasmo. Los valores de  $FEV_1$  que se obtengan servirán para hacer los cálculos posteriores. A continuación se administra la metacolina en aerosol. Para ello existen dos tipos de protocolos:

**1º.- Aerosoles durante todo el ciclo respiratorio**

Es el método propuesto por Cockcroft (176). La concentración de la dilución inicial es de 0.03 mg/ml y va doblándose en cada paso hasta alcanzar la máxima de 16 mg/ml. El aerosol se administra, mediante un nebulizador Wright, durante 2 minutos. La nariz permanece ocluida durante ese tiempo con una pinza. Es recomendable utilizar siempre el mismo tipo de aparato nebulizador, con un volumen de reservorio de 3 ml, un débito continuo entre 0.13 y 0.16 ml/min (ajustando el flujo a través del nebulizador entre 7 y 9 l/min) y el empleo de mascarillas sin ventanas externas. La prueba finaliza cuando el  $FEV_1$  cae mas de un 20% respecto al obtenido tras la administración de la solución de dilución, o cuando se alcanza la concentración máxima.

**2º.- Aerosol solo durante la inspiración**

La administración de metacolina en aerosol se produce únicamente cuando el sujeto realiza una maniobra de inspiración. El tipo de nebulizador mas utilizado es el DeVilbiss 646. Se conecta a

un dosímetro de Rosenthal-French que se activa al iniciar el paciente la inspiración, ocasionando la entrada de un flujo de aire comprimido a 20 psi y generando la producción de un aerosol durante un tiempo determinado, habitualmente 0,6 segundos. Existe la posibilidad de utilizar nebulizadores DeVilbiss 41 o 42 que ofrecen la posibilidad de adaptar una pera de goma que al comprimirla al inicio de la inspiración, genere la producción del aerosol.

A su vez, con este tipo de aerosoles existen distintos protocolos para realizar la prueba de provocación. Básicamente se distinguen:

**a.- Protocolo de Chai y cols. (177)**

El primer paso consiste en realizar 5 inhaciones de la dilución inicial de metacolina, que es de 0,1 mg/ml. Después, sucesivamente se va doblando la concentración de la dilución a emplear hasta alcanzar la máxima de 50 mg/ml. El intervalo que media entre la realización de las 5 inhalaciones y la medición de la función pulmonar es de 3 minutos. Tras ello se comprueba si el FEV<sub>1</sub> ha caído más de un 20% respecto al obtenido tras la administración de la solución de dilución. Si es así se suspende la prueba. En caso contrario se continua hasta alcanzar la dilución de concentración máxima.

**b.- Protocolo de Chatham y cols. (178)**

Es una variante del anterior y el que nosotros hemos seguido. Básicamente consiste en acortar la duración de la prueba empleando 3 tipos de concentraciones de metacolina (5 mg/ml, 25 mg/ml y 50 mg/ml) y diferente número de inhalaciones en cada paso. La descripción completa se realiza mas adelante.

En estos métodos se utiliza el término de **unidad inhalada** (UI) que se define como la inhalación de una solución que contuviera 1 mg/ml de la sustancia administrada. De ese modo, si se realizan cinco inhalaciones de dicha solución se tendrían 5 unidades inhalativas. Si el paciente precisa mas cantidad de metacolina las nuevas unidades que se vayan administrando se suman a las anteriores y pasan a llamarse **unidades acumulativas** (UA). Las sucesivas dosis administradas se



llevan al eje de abscisas de un sistema de coordenadas, mientras que los cambios inducidos en el FEV<sub>1</sub>, en cada paso del test, se representan en el eje de ordenadas. Utilizando un papel logarítmico se facilita la representación y se puede calcular la **dosis de provocación PD<sub>20</sub>** para FEV<sub>1</sub>, que se define como la dosis acumulativa que produce un descenso del FEV<sub>1</sub> del 20%.

No se han observado variaciones importantes en los resultados obtenidos por cualquiera de los métodos señalados (179).

El test de provocación con metacolina puede alterarse por toda una serie de circunstancias que a continuación enumeramos:

**a.- Fármacos**

Es recomendable que el individuo no tome nada cuando se vaya a realizar la prueba, pues potencialmente cualquier fármaco podría interferir con el resultado. Hay una serie de ellos cuya acción se ha estudiado mejor, habiéndose formulado las siguientes recomendaciones para suspender previamente la medicación (180):

Teofilinas de acción corta.....	18-24 horas
Teofilinas de acción retardada.....	48 horas
β-adrenérgicos.....	12 horas
Cromoglicato.....	8 horas
Nedocromil.....	12 horas
Anticolinérgicos.....	12 horas

También se ha visto que los bloqueantes del calcio pueden alterar la respuesta a la provocación con metacolina, por lo que conviene suspenderlos antes. Por el contrario, no parece necesario interrumpir la administración de corticoides.

**b.- Infecciones respiratorias del tracto superior**

Como anteriormente se comentó, las infecciones respiratorias de vías altas aumentan la HRB, tanto en adultos como en niños. En los individuos sanos se trata de una hiperreactividad transitoria que dura como máximo 6-8 semanas, por lo que se recomienda aplazar la prueba ese tiempo, en el caso de que existan antecedentes de infección respiratoria (181). Algo semejante reza para la vacunación antigripal (182), aunque no todos los autores están de acuerdo (183).

#### **c.- Irritantes inespecíficos**

Entre las sustancias irritantes que se han estudiado figura el tabaco. No hay unanimidad sobre cuanto tiempo debe suspenderse la exposición al tabaco en un fumador habitual, antes de realizarse la provocación, pero se ha llegado al consenso de que el paciente se abstenga de fumar varias horas antes del test, igual que para la realización de cualquier prueba respiratoria. No hay datos referentes a los fumadores pasivos.

Otros irritantes como el ozono (184) y el dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) (185) también alteran la respuesta a la metacolina. Con el dióxido de nitrógeno existe un ligero aumento de la hiperreactividad (186).

Con respecto a la niebla se ha comprobado que, tras la nebulización de agua destilada en el laboratorio, se causa un aumento transitorio de la hiperreactividad bronquial en sujetos asmáticos (187), pero no en individuos sanos.

#### **d.- Provocación antigénica**

Cuando se produce una respuesta dual o tardía con la provocación antigénica, aumenta la HRB (188). Esta situación puede mantenerse hasta 1 semana.

#### **e.- Sustancias ingeridas**

En algunos sujetos se ha descrito aumento de la HRB tras la ingestión de helados (189), bebidas de cola (190) y tartracina (191), aunque estas alteraciones no parecen revestir importancia clínica.

**f.- Ritmo circadiano**

La HRB varía según las horas del día, aumentando por la noche (192).

**g.- Edad**

Tanto en niños como en ancianos existe un pequeño incremento de la reactividad bronquial (193).

**h.- Grado de obstrucción de la vía aérea**

Se ha visto que la respuesta a la provocación con metacolina se produce antes si se parte de un cierto grado de obstrucción de la vía aérea. Esto se hace mas evidente en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica que en asmáticos (194).

Aparte de su aplicación en estudios epidemiológicos y clínicos de investigación, la provocación con metacolina se ha utilizado como prueba para asegurar la presencia de asma. Este es un punto controvertido pues, aunque la mayoría de los asmáticos presentan HRB, es cuestionable que la existencia aislada de esta última constituya por si misma una prueba de asma

Los estudios de provocación en poblaciones asmáticas indican que una respuesta anómala a la histamina o a la metacolina es una prueba sensible con alto valor predictivo negativo. Además, se ha dicho que el grado de reactividad a la metacolina o a la histamina guarda relación con las alteraciones de la función pulmonar, el grado de síntomas y el tratamiento necesario para su control (195). El nivel de reactividad también se ha relacionado con las fluctuaciones diurnas de la tasa de flujo espiratorio máximo y con la respuesta a los broncodilatadores (196).

En estudios realizados en niños sanos no atópicos Hopps y cols. (197) obtuvieron una especificidad del 95% cuando utilizaron la dosis de 8 mg/ml (equivalente a 80 U.A.) de metacolina como punto de corte. También observaron que podían producirse falsos negativos en sujetos atópicos con alergia estacional, si la prueba se realizaba en otra época del año. Hargreave y cols. (198) observaron, en un grupo de adultos sanos sin historia de asma, que el 9% mostraba una caída

del  $FEV_1 > 20\%$  con la misma dosis de 8 mg/ml. Rhodes y cols. (199) vieron que el 29% de los adultos jóvenes sanos presentaba caída de la función respiratoria con concentraciones de metacolina iguales o inferiores a 25 mg/ml (equivalente a 250 U.A.)

Estas observaciones sugieren que las normas para realizar provocaciones bronquiales, inicialmente publicadas por Chai y cols. (177), en las que se daba como positiva una respuesta a dosis iguales o menores de 250 U.A., presentan una buena sensibilidad, pero fallan en cuanto a la especificidad y valor predictivo positivo para el diagnóstico del asma. Por otro lado, el término falso positivo aplicado a sujetos normales con valores de  $PD_{20}$  menores o iguales a 80 U.A. debe tomarse con cautela, ya que están clasificados como individuos sanos por su falta de clínica, pero se ignora el significado que esa hiperreactividad pueda tener en el futuro. Algunos autores sugieren que la HRB de estos sujetos constituiría un factor de riesgo para desarrollar enfermedad crónica de la vía aérea en el futuro (200).

#### **I.4.2.- Respuesta bronquial al ejercicio físico**

Cuando un sujeto realiza ejercicio físico se produce broncodilatación y aumentan los índices y los volúmenes del flujo espirado. La mejoría de la función pulmonar se expresa como un porcentaje de aumento respecto a los valores obtenidos basalmente. La diferencia no suele superar el 5%. Probablemente la broncodilatación se debe a la conjunción del descenso del tono vagal y la estimulación de los receptores  $\beta$  por parte de la adrenalina liberada durante el ejercicio. En las personas sanas el descenso del tono vagal es predominante, ya que se ha comprobado que la broncodilatación no es bloqueada por el propranolol, antagonista de los receptores  $\beta$ . El descenso del tono vagal también explicaría la mejoría observada en los asmáticos. Incluso tras haber logrado una función pulmonar óptima, empleando simpaticomiméticos a dosis elevadas antes del ejercicio, se sigue produciendo broncodilatación. Como la crisis de asma, de producirse, lo hace después y no durante la realización del ejercicio se ha pensado que tanto el descenso del tono vagal como la adrenalina liberada servirían para retrasar el comienzo de dicha broncoconstricción (201).

Parece que la causa del broncoespasmo, que acontece en algunos pacientes asmáticos cuando se les somete a ejercicio físico, se debe a diversos factores entre los que se incluye la pérdida de agua por la vías respiratorias. En condiciones normales, a volúmenes de ventilación bajos, la mayor parte del acondicionamiento del aire inspirado la realiza la mucosa nasal. Si se efectúa ejercicio físico intenso se produce un incremento de la ventilación y son las vías aéreas de gran calibre las que aportan calor y agua extras para acondicionar el aire inspirado. Como el aire espirado presenta una saturación de agua casi total, la magnitud de las pérdidas hídricas depende de la concentración de agua en el aire inspirado y de la ventilación durante el ejercicio. La pérdida de agua por el aparato respiratorio da lugar a enfriamiento de las vías aéreas de gran calibre y a la deshidratación de su revestimiento mucoso, aumentando por tanto la concentración de iones en el líquido periciliar. Cualquiera de estos dos estímulos, el enfriamiento o la hiperosmolaridad del líquido periciliar, o los dos, podrían ocasionar broncoconstricción tras el ejercicio.

Se ha visto que esta broncoconstricción se evita, a menudo por completo, cuando se inspira aire totalmente saturado y a temperatura corporal mientras se practica el esfuerzo, y sin embargo se hace mas intensa si se respira aire frío y seco (202). Lo que no se sabe es como este aire frío induce la contracción de la musculatura lisa bronquial ni por qué la respuesta máxima se produce después del ejercicio, cuando ya se ha eliminado este estímulo. Así mismo se ha visto que, aunque en algunos pacientes aumenta la respuesta cuando la temperatura del aire inspirado baja a valores inferiores a 0°C, no siempre sucede en todos (203), mientras que cuando varia la concentración de agua en el aire inspirado existe una relación directa entre la cantidad total de agua perdida durante el ejercicio y el grado de broncoconstricción. Sería la hiperosmolaridad la que, en último término, ocasionaría la broncoconstricción. Se sabe que los nervios no mielinizados, presentes en el epitelio y en la submucosa, son sensibles a los cambios de la osmolaridad. Por otra parte, se piensa que la hiperosmolaridad podría ocasionar la liberación de mediadores (204).

Cuando un sujeto asmático realiza ejercicio físico se producen los siguientes cambios:

### **1.- Aumento de catecolaminas y AMPc:**

Los asmáticos presentan aumentos normales de catecolaminas plasmáticas y de AMPc en respuesta al ejercicio físico (205). La importancia de estas catecolaminas circulantes en la modulación del tono de las vías aéreas durante o después del ejercicio no está clara, aunque es probable que tanto los receptores  $\alpha$  como los  $\beta$  sean estimulados por la adrenalina y noradrenalina. Quizás por esa razón el broncoespasmo no comienza mientras se está haciendo ejercicio, sino después de finalizar este. Los receptores  $\alpha$  estimulados relajarían el músculo liso de los vasos sanguíneos y favorecerían el retorno de calor y agua a las vías aéreas. Los agonistas  $\alpha$  impiden el desarrollo de broncoespasmo tras esfuerzo físico y esto lo podrían conseguir antagonizando los efectos de la noradrenalina sobre el músculo liso bronquial o sobre los receptores  $\alpha$  de los ganglios parasimpáticos donde inducen un aumento del tono vagal sobre el músculo liso, con lo que evitarían en broncoespasmo.

### **2.- Liberación de histamina:**

En el 50% de los sujetos en los que el ejercicio provoca broncoconstricción, se produce un aumento de la histamina circulante. No se conoce su origen, existiendo controversia a cerca de si proviene de los mastocitos de la mucosa bronquial o de los basófilos circulantes. Tras la hiperventilación también existe aumento de histamina circulante (206). Sin embargo se ignora el significado que pueda tener este.

### **3.- Actividad quimiotáctica de los neutrófilos:**

En el 75% de los asmáticos que presentan broncoespasmo tras ejercicio se detecta una elevación del factor quimiotáctico para los neutrófilos (Neutrophil Chemotactic Factor, NCF) en el suero (207). Esto también sucede tras la provocación alérgica, pero no tras la provocación con histamina o metacolina. Tampoco se ha detectado este aumento en personas normales, ni en las asmáticas cuando realizan ejercicio inhalando aire caliente y húmedo o cromoglicato disódico. No se sabe si este NCF procede de los mastocitos pulmonares o si su presencia es un marcador de la activación de los mastocitos. De cualquier forma los leucocitos son atraídos a la luz de la vía aérea y

pueden liberar otras sustancias que, a su vez, contribuirían a la resolución del broncoespasmo o al desarrollo de una reacción de fase tardía.

#### 4.- Metabolitos de la vía del ácido araquidónico:

No se ha demostrado el aumento de prostaglandina  $\text{PGF}_{2\alpha}$  después del ejercicio, pero sí de la  $\text{PGE}_2$  en los asmáticos que no presentan broncoconstricción con el ejercicio. Esta prostaglandina actuaría como broncodilatadora y por lo tanto ejercería una acción protectora durante la prueba de esfuerzo.

#### 5.- Edema de la mucosa bronquial

En los sujetos que responden con broncoespasmo, tras provocación con ejercicio físico, se produce un edema de la mucosa bronquial, de origen vascular. Se piensa que este jugaría un papel mas importante que la misma contracción del músculo liso bronquial (208).

Tras el broncoespasmo inducido por el ejercicio se puede ocasionar una respuesta de fase tardía, que es mas común en niños que en adultos y guarda relación con la gravedad de la respuesta inicial (209). Ultimanente se ha cuestionado su existencia (210).

Después del broncoespasmo inducido por ejercicio existe un periodo refractario, que se define como el tiempo durante el cual una segunda provocación daría lugar a una respuesta de las vías aéreas menor de la mitad de la respuesta inicial. Habitualmente dura entre 1 y 3 horas. Aparece en el 50% de los sujetos. No es posible predecir quien va a presentar este periodo refractario y quien no y su aparición es independiente de la gravedad del asma inducido con la primera provocación (211). También se ha observado que la práctica de pequeñas carreras de 30 segundos de duración, a intervalos de 2 minutos, efectuadas 30 minutos antes de un ejercicio prolongado, reducen la intensidad del broncoespasmo en la mayoría de los casos. No se sabe como se produce este periodo refractario. Se ha visto que estos pacientes pierden agua en su vía aérea igual que los demás y tampoco está protegido su músculo liso bronquial, pues siguen respondiendo a la histamina y a la metacolina durante dicho periodo. Dado que el periodo refractario es abolido por la

indometacina, es posible que las prostaglandinas, especialmente la  $PGE_2$  liberada durante el ejercicio y en respuesta a la broncoconstricción sirva para proteger a la vía aérea de ulteriores provocaciones (212). Otra teoría que se baraja es que la hiperosmolaridad ocasionada por la pérdida de agua tras el primer ejercicio, atraería agua a la luz bronquial, con lo que la pérdida de líquido se notaría menos al realizar el segundo ejercicio. Además, la hiperemia ocasionada durante el primer esfuerzo serviría para mantener más caliente la vía aérea en el segundo (208).

Para llevar a cabo la prueba de esfuerzo es preferible que el individuo se encuentre asintomático y los índices de flujo aéreo en reposo superen el 75% de los valores predecibles. Los resultados difieren según el método empleado (carrera libre, bicicleta ergométrico o tapiz rodante) y según la duración de la prueba. En condiciones ambientales normales, con una temperatura entre 19 y 21°C, el ejercicio se debe realizar durante 6-8 minutos, con la máxima carga de trabajo posible, en general entre el 70 y el 80% de la capacidad de trabajo prevista para el paciente, pudiendo ayudarse de la monitorización de la frecuencia cardiaca que no debe sobrepasar el 80% de la frecuencia máxima prevista para la edad (213) (214). Cuando el aire inspirado es seco y frío la duración de la prueba puede reducirse a 4 minutos. Si se utiliza el tapiz rodante se modifica el porcentaje de su inclinación y su velocidad según la condición física del individuo en cuestión.

Se recomienda suspender los broncodilatadores inhalados de 4 a 6 horas antes, si son administrados por vía oral de 6 a 36 horas, las teofilinas retardadas 24 a 36 horas y el cromoglicato 48 horas.

Las determinaciones de  $FEV_1$  y PERF son suficientes para calcular la caída de la función respiratoria (214). Las monitorizaciones se realizan antes de la prueba y al minuto de haber finalizado, continuándose después con repeticiones cada 5 minutos durante la primera media hora. Si se produce la caída de la función respiratoria se puede revertir fácilmente con el empleo de un  $\beta$ -adrenérgico inhalado.



Constituye una contraindicación para realizar la prueba de esfuerzo la presencia de cardiopatía (especialmente si no se dispone de ECG), patología musculo-esquelética importante, infecciones respiratorias o neumopatías que alteran la saturación arterial de oxígeno.

## **II. OBJETIVOS DEL TRABAJO**

Se ha dicho que las pruebas de provocación bronquial con metacolina y con ejercicio físico servirían para detectar a los pacientes asmáticos, así como para cuantificar la gravedad del asma. Con el propósito de alcanzar un mejor conocimiento sobre las polinosis, tanto con manifestación exclusivamente rinoconjuntival como causante de asma, nos propusimos explorar la hiperreactividad bronquial en pacientes afectados de esta patología.

Nos centramos en el estudio de las polinosis por ser estos cuadros, especialmente los debidos a sensibilización a gramíneas, muy frecuentes en nuestro medio, afectando cada vez más a niños en edades muy precoces y constituyendo un núcleo muy importante de pacientes en cualquier Unidad de Alergia de nuestro entorno.

Hemos pretendido correlacionar la patocronia de las polinosis, especialmente la existencia de una posible evolución hacia el asma, asma oculto, con la historia clínica, estudios complementarios biológicos, pruebas cutáneas, conjuntivales y de función pulmonar tras provocaciones específicas e inespecíficas.

Tratamos así de llegar a pronosticar cuál va a ser la evolución de un niño con polinosis, según la intensidad del cuadro y la existencia o no de "asma oculto", fundamentalmente en cuanto a la posibilidad de desarrollo de un cuadro asmático se refiere. Todo ello con el objeto de precisar qué pruebas resultan útiles para detectar las situaciones que requerirán un tratamiento activo e intenso, y qué casos, por el contrario, no deberán ser sometidos más que a terapéuticas sintomáticas o de mantenimiento, por no presentar riesgo de evolución peligrosa o grave.

### **III. MATERIAL Y METODOS**

### **III.1.- Población estudiada**

Se estudiaron un total de 101 pacientes sensibilizados al polen de gramíneas, de los que 49 sufrían rinoconjuntivitis y 52 rinoconjuntivitis y asma. Ninguno había sido sometido previamente a inmunoterapia con pólenes. El reclutamiento y estudio inicial se hizo en dos periodos: durante el invierno de 1988-89 para los 52 primeros y durante el invierno 1990-91 para los 49 restantes. Se realizó un seguimiento clínico de tres años, con dos controles tras el diagnóstico; uno en la primavera siguiente, y otro después de la tercera primavera, lo que correspondió a la primavera de 1989 y al otoño-invierno de 1991 para el primer grupo y a la primavera de 1991 y al otoño-invierno de 1993 para el segundo grupo.

En la primera visita se obtuvo una ficha clínica en la que se recogían los siguientes datos:

**1.- Antecedentes familiares en primer y segundo grado de:**

- a.- asma
- b.- alergia ( rinitis, conjuntivitis, dermatitis atópica, alergia alimentaria)
- c.- padres fumadores ( mas de 10 cigarrillos/día)

**2.- Antecedentes personales de:**

- a.-asma previo
- b.- alergia (rinitis o conjuntivitis por sensibilización a otros alergenos, dermatitis atópica, alergia alimentaria)

**3.- Historia clínica**

- a.-forma de comienzo de la polinosis
- b.-edad en que se inició la rinoconjuntivitis
- c.-edad en que se inició el asma
- d.-tiempo de evolución hasta llegar a la consulta

- e.-grado de afectación rinoconjuntival en la última primavera
- f..-presencia o no de asma en la última primavera
- g.-sintomatología nasal fuera de la primavera
- h.-presencia o no de asma fuera de la primavera
- i.-presencia actual de dermatitis atópica

Para calificar la afectación rinoconjuntival en la última primavera se preguntó específicamente por los siguientes síntomas:

- congestión nasal
- rinorrea
- estornudos
- picor nasal
- picor ocular
- lagrimeo
- enrojecimiento conjuntival

Se pidió al paciente o a sus familiares que calificara cada síntoma como leve, moderado o severo.

En cuanto al asma, se preguntó si el paciente había presentado crisis de disnea, opresión torácica, tos seca en accesos, sibilancias o dificultad respiratoria; circunstancias que pudieron desencadenar el cuadro, como salidas al campo, ejercicio físico o infecciones respiratorias; intensidad y duración de los síntomas así como tipo de medicación que tomó y número de días que precisó dicha medicación y/o necesidad de atención en un Servicio de Urgencias para tratamiento mas intenso u hospitalización.

De acuerdo con estos datos clasificamos el asma siguiendo los criterios establecidos por el Consenso Internacional Pediátrico sobre el Asma (215):

**1.- Asma leve:**

Síntomas leves o intermitentes menos de dos veces por semana.

Menos de dos episodios de asma nocturno al mes.

Menos de una crisis al mes.

Asintomático entre las exacerbaciones.

Tolera bien el esfuerzo.

**2.- Asma moderado:**

Más de dos exacerbaciones al mes.

Más de dos episodios de asma nocturno al mes.

Más de una crisis al mes.

Mantiene síntomas entre las exacerbaciones.

**3º.- Asma grave:**

Crisis frecuentes que precisan asistencia hospitalaria.

Síntomas nocturnos.

Síntomas continuos.

No tolera el esfuerzo.

Absentismo escolar frecuente.

Exacerbación previa grave.

En el momento del diagnóstico se realizaron los estudios complementarios que a continuación detallaremos. Además, se practicó una radiografía de senos maxilares.

Una vez concluida esta primera fase del estudio y alcanzado el diagnóstico, se trató con inmunoterapia pre-estacional a todos los pacientes durante tres años.

Durante este periodo de tiempo programamos para nuestro estudio dos valoraciones de los pacientes: en la primavera siguiente al momento del diagnóstico, y pasadas tres primaveras después del mismo. De este modo podíamos obtener una visión evolutiva de los pacientes durante un tiempo aceptable.

La evaluación en la primera primavera fue únicamente clínica. Después de la tercera primavera (con tres años de evolución) se realizaron, además, pruebas de provocación con metacolina y con ejercicio físico.



### **III.2.-Estudios complementarios**

#### **III.2.1.-Pruebas alérgicas cutáneas**

En primer lugar se procedió a verificar el diagnóstico alergológico mediante la realización de test cutáneos, cuyo objetivo es la identificación de anticuerpos específicos IgE unidos a los mastocitos de la piel. Se empleó la técnica de la punción modificada o prick-test, para la que se utilizaron lancetas Dome/Hollister-Stier y el siguiente panel de alérgenos (Farmacia): *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Alternaria tenuis*, *Cladosporium herbarum*, epitelio de perro, caspa de gato, *Lolium perenne*, *Artemisa vulgaris*, *Plantago lanceolata* y *Olea europea*. Se empleó histamina al 1%, como control positivo y suero fisiológico como control negativo.

La técnica empleada fue la siguiente:

1º.- Limpieza de la piel de la cara anterior del antebrazo con alcohol isopropílico, dejando a continuación que se evaporara.

2º.- Colocación de una gota de cada solución antigénica, de la histamina y del control sobre la piel, manteniendo una separación de 2 cm entre cada una.

3º.- Introducción en la piel de la lanceta, formando un ángulo de 45 grados, realizando un pequeño ascenso dentro de la piel al retirarla.

4º.- Absorción del líquido de la superficie mediante papel secante, esperando 15 minutos para valorar la respuesta.

5°.- Lectura del resultado dibujando el contorno de cada pápula con un lápiz dermatográfico. A continuación, se cubría el dibujo con un papel de celofán (transpore) y se trasladaba a un papel milimetrado para obtener el área de cada pápula por planimetría.

Al tamaño de la pápula de cada alérgeno se restó el de la pápula obtenida con la solución control, si es que se había producido alguna. Finalmente, se comparó el tamaño resultante con el de la pápula conseguida con la histamina. Se consideraron positivas solo las pápulas de tamaño igual o superior a la de la histamina.

### **III.2.2.-Test de la dilución de punto final**

En una segunda fase se realizó el test de la dilución de punto final o prick-end. Para ello se utilizaron las diluciones de Lolium que después se emplearon en la prueba de provocación bronquial y que eran las siguientes: 10, 100, 1.000, 10.000 y 100.000 U.B./ml.

Con la técnica del prick-test, antes descrita, se determinó cual de estas soluciones era capaz de producir una pápula de 2 mm de diámetro, considerándose esta la dilución de punto final.

### **III.2.3.-Determinación de eosinófilos en sangre**

Para determinar los eosinófilos totales en sangre periférica se realizó una extracción sanguínea y se procedió de la siguiente manera:

1°.- Se realizó una extensión de sangre periférica.

2°.- Se procedió a su tinción con Eosina-Azul de Metileno (solución según Wright).

3°.- Con el microscopio óptico se realizó el recuento de 100 células.

Solo se tuvieron en cuenta los recuentos superiores a  $500/\text{mm}^3$

#### **III.2.4.- Determinación de la IgE total**

La cuantificación de IgE total se realizó mediante un test de enzimoensayo (Pharmacia) cuya técnica es la siguiente:

- 1º.- Se dispone de dos baterías de 14 tubos cada una, marcados del 1 al 14.
- 2º.- Se añade un disco anti-IgE al fondo de cada tubo.
- 3º.- Se pipetea 100  $\mu\text{l}$  de solución estándar sobre los discos de los tubos 1 al 14.
- 4º.- Se cubren los tubos con papel de plástico y se dejan tres horas a temperatura ambiente.
- 5º.- Se añaden 2.5  $\mu\text{l}$  de solución de lavado, previamente diluida con 1 litro de suero salino al 0.9%, a cada tubo y se aspira. Esta operación se realiza tres veces en total, sabiendo que al final hay que dejar seco el tubo.
- 6º.- Sobre los discos de cada tubo se pipetea 100  $\mu\text{l}$  de enzima-anti-IgE.
- 7º.- Los tubos se cubren con papel de plástico y se dejan incubar toda la noche.
- 8º.- A continuación, se vuelven a lavar los tubos como se indicó en el punto 5º.
- 9º.- Se pipetea 200  $\mu\text{l}$  de solución desarrollante sobre el disco de cada tubo y sobre dos tubos adicionales que han permanecido vacíos.

10°.- Se cubren todos los tubos con papel de plástico y se incuban a 37°C durante 1 hora.

11°.- En cada tubo, incluso los que no tienen disco, se pipetea 100 µl de una solución frenadora

12°.- Se mide la absorción a 420 nm. de todos los tubos, usando los que han permanecido sin discos para ajustar el cero.

Los resultados obtenidos se compararon con los de una población normal, según los valores previamente establecidos (216).

### **III.2.5.- Determinación de la IgE específica**

Se procedió a la determinación de anticuerpos IgE específicos frente a *Lolium* mediante una técnica de enzimoensayo basada en el RAST (Radio-Allergo-Sorbent-Test). En este último los antígenos están pegados a unos discos de papel de filtro que se depositan en distintos tubos de ensayo, a los que se agrega el suero del paciente que teóricamente contiene IgE específica frente a uno o varios antígenos determinados. Se forma, sobre la superficie del disco, un complejo antígeno-IgE específica. A continuación, y mediante lavado, se eliminan las proteínas del suero que no están unidas al disco. Entonces se agrega un anticuerpo-IgE marcado con yodo radiactivo que se fija específicamente al complejo anterior. Se procede a realizar un nuevo lavado, para eliminar el exceso de antisuero marcado, y se mide la IgE radiactiva unida al complejo IgE específica-disco-alergeno, mediante un contador gamma. Los valores obtenidos se expresan en una escala de cero a cuatro en relación con los valores de cuatro diluciones conocidas de un suero de referencia (217).

Para determinar la IgE específica frente a *Lolium*, mediante enzimoensayo, se procede de la siguiente manera:

1°.- Se coloca en cada tubo un disco de papel en el que va unido el alérgeno.

2º.- En un tubo de ensayo se pone en contacto el suero del paciente con dicho disco, permitiendo que se pueda formar un complejo disco-alergeno-IgE específica.

3º.- Se añade un enzima unido a un anticuerpo anti-IgE, capaz de ligarse al anterior complejo.

4º.- Por último, se añade un sustrato y un agente reductor, permitiéndose que el enzima actúe sobre el sustrato, con lo que se emite una radiación lumínica coloreada que se cuantifica por espectrofotometría.

Los resultados se expresan en una escala de cero a cuatro.

### **III.2.6.- Prueba de provocación conjuntival**

Se realizó el test de provocación conjuntival utilizando extracto de polen de *Lolium Pharmacia*, procediéndose según la técnica previamente descrita por Möller (218):

1º.- En el saco conjuntival del ojo izquierdo se aplicó una gota de suero salino fisiológico, empleado como diluyente del antígeno, y en el saco conjuntival del ojo derecho una gota de dilución de extracto de polen de *Lolium* que contenía 500 U.B./ml.

2º.- Se esperó 10 minutos y se procedió a la lectura del resultado. Este se consideró como positivo si aparecía cualquier signo de afectación conjuntival, como prurito ocular, lagrimeo y/o enrojecimiento de al menos 2/3 de la conjuntiva del ojo. En este caso se interrumpía la provocación y se procedía al lavado del ojo con suero fisiológico y aplicación de 1 gota de colirio corticoideo.

3º.- En caso de negatividad se continuaba la prueba aplicando, en el saco lagrimal del ojo derecho, una gota de dilución del extracto que contenía 1.000 U.B./ml, mientras

que en el ojo izquierdo se aplicaba una gota de suero fisiológico, esperando después 10 minutos y procediendo como en el punto anterior.

4º.- Si también se obtenía un resultado negativo se continuaba aplicando esta vez la dilución antigénica ( con 10.000 U.B./ml) en el ojo izquierdo y el suero fisiológico en el derecho. Si a los 10 minutos no se observaba ninguna anomalía se terminaba la prueba después de aplicar la dilución antigénica superior (100.000 U.B./ml) en el ojo derecho y el suero salino en el izquierdo, procediendo como antes hemos apuntado.

Al inicio de la prueba y al final de la misma se realizó una espirometría, comprobándose que en ningún caso se había producido afectación de las vías respiratorias.

### **III.2.7.- Pruebas de provocación bronquial**

Finalmente se pasó a realizar los tests de provocación bronquial, para lo cual nos aseguramos de que los niños no habían padecido ningún cuadro infeccioso respiratorio, ni habían recibido ninguna vacuna con virus vivos atenuados en las últimas 6 semanas. Así mismo comprobamos que no estaban recibiendo ninguna medicación.

Todas las pruebas de provocación bronquial se realizaron a primera hora de la mañana, en días diferentes separados entre si por una semana. En el día de su realización se recomendó que el paciente no desayunara te, chocolate o café, con objeto de impedir que las xantinas naturales pudieran interferir con los resultados. Así mismo se mantuvo al niño en reposo durante una hora, antes del comienzo de la prueba, evitando el contacto con humo de tabaco.

Para la realización de las provocaciones bronquiales con metacolina y con Lolium se empleó un dosímetro nebulizador, marca APS de Jaeger, que genera partículas de 3-4 micras de diámetro aerodinámico de masa media (MMD), con lo que se minimiza el depósito de las partículas en orofaringe. El aparato posee un mecanismo valvular que permite la apertura del circuito cuando el paciente inicia la maniobra de inspiración forzada. De esta forma se asegura

que, en cada inhalación que realiza, el sujeto recibe una cantidad fija, de unos 5  $\mu$ l, de solución en aerosol, con una presión de trabajo de 1,6 bar (1,632 cm de H<sub>2</sub>O) y durante un tiempo de 0.6 segundos.

La medición de la función pulmonar se realizó en un neumotacómetro, marca Pneumotacómetro de Jaeger, obteniéndose curvas flujo-volumen mediante la realización de una maniobra de espiración forzada que partía de una situación de inspiración máxima. Los parámetros recogidos fueron los siguientes:

CVF: capacidad vital forzada

FEV<sub>1</sub>: volumen espiratorio forzado en el primer segundo

PEF: pico espiratorio forzado

FEF<sub>25-75%</sub>: flujo espiratorio forzado entre en 25 y el 75% de la curva obtenida con la maniobra de espiración forzada

Para llevar a cabo el test de provocación con metacolina se empleó el protocolo abreviado de Chatham (178) con alguna modificación introducida por nosotros. Utilizamos dos diluciones de metacolina, de 5 mg/ml y de 25 mg/ml, y el protocolo seguido fue el siguiente:

Nº Inhalaciones	Dilución	U.I.	U.A.
1	5 mg/ml	5	5
4	5 mg/ml	20	25
1	25 mg/ml	25	50
2	25 mg/ml	50	100
4	25 mg/ml	100	200
8	25 mg/ml	200	400

**U.I.: Unidad Inhalada.** Una U.I. corresponde a una inhalación de una solución de metacolina de 1 mg/ml.

**U.A.: Unidad Acumulada.** A cada dosis de metacolina se le supone un valor acumulativo, por lo que se corresponde a la suma de las dosis administradas hasta ese momento.

La solución de metacolina se preparó en el Servicio de Farmacia de nuestro Hospital, utilizando como diluyente una solución que contenía, por cada 100 ml: 0.5 gramos de ClNa, 0.4 gramos de fenol, 0.275 gramos de bicarbonato sódico y el resto agua destilada. Una vez diluida se conservó a 4°C , en nevera y se renovó cada mes.

Para llevar a cabo el test se procedió de la siguiente manera:

**1°.-** Se obtuvo una prueba de función respiratoria basal, para lo que se practicó una maniobra de espiración forzada, seguida de una inspiración forzada y, a continuación, una nueva maniobra de espiración forzada. Todo ello se repitió tres veces, seleccionando el aparato, de forma automática, la mejor de todas las mediciones. Se comprobó que el valor del FEV<sub>1</sub> obtenido era superior al 80% del calculado para una población normal de la misma edad, sexo y talla del paciente (219).

**2°.-** A continuación se realizaron 5 inhalaciones de la solución buffer, empleada como diluyente de la metacolina .

**3°.-** Después de 3 minutos de espera se repitió la medición de la función pulmonar. Si el FEV<sub>1</sub> no se mantenía por encima del 80% del basal se suspendía la prueba, pues significaba que la hiperreactividad del sujeto era tal que solo con la inhalación del diluyente a emplear se le provocaba broncoespasmo. Esto no ocurrió nunca, por lo que se pudo seguir adelante en todos los casos.



4º.- Posteriormente se administró una inhalación de una dilución de metacolina que contenía 5 mg/ml. Se esperó tres minutos y se obtuvo una nueva función pulmonar. Tomando como referencia el valor del FEV<sub>1</sub>, obtenido tras la inhalación de la solución buffer, y comparándolo con el actual, se observó si existía una diferencia superior a un 20%, en cuyo caso se suspendía la prueba. Si no se seguía adelante.

5º.- El siguiente paso consistía en administrar 4 inhalaciones de la misma dilución de metacolina. Se esperaba tres minutos y se procedía a la medición de la función respiratoria, siguiendo los pasos antes descritos. El resultado del FEV<sub>1</sub> se comparaba con el obtenido tras la inhalación de la solución buffer y se suspendía la prueba si se observaba una caída superior al 20%.

6º.- Si la caída era inferior al 20% se administraba 1 inhalación de una dilución de metacolina que contenía 25 mg/ml. Se esperaba tres minutos y se repetía la función respiratoria. Si el FEV<sub>1</sub> no caía por debajo de 20%, como antes se indicó, se continuaba la prueba administrando 2 inhalaciones de la misma solución. Si a los tres minutos el FEV<sub>1</sub> continuaba por encima del 20% se realizaban 4 inhalaciones y si el FEV<sub>1</sub> no descendía mas de un 20% se administraban 8 inhalaciones, tras de lo cual se daba por finalizada la prueba.

7º.- Si se obtenía una caída de la función respiratoria, en cualquiera de los pasos, se administraba un  $\beta$ -adrenérgico inhalado y se mantenía al niño en observación durante 30 minutos, al cabo de los cuales se constataba la normalización clínica y de la función respiratoria.

8º.- Los resultados obtenidos se trasladaban a un gráfico de papel semilogarítmico donde figuraban, en las ordenadas, los porcentajes de FEV<sub>1</sub> obtenidos en cada paso, y en las abscisas las sucesivas dosis de metacolina administradas. Se trazaba una curva que unía los correspondientes puntos y se calculaba sobre el papel qué dosis de

metacolina ( $PD_{20}$  o dosis de provocación) era la que habría causado exactamente la caída de un 20% del  $FEV_1$ .

A continuación se procedió a realizar el test de provocación con ejercicio físico. Para ello utilizamos un tapiz rodante (Cintergotest) y un monitor iMC4 para monitorización constante de la frecuencia cardíaca y registro electrocardiográfico.

El procedimiento seguido se ajustaba a las recomendaciones de la Sociedad Europea de Enfermedades Respiratorias (220) y fue el siguiente:

1º.- Se obtuvo una medición de la función respiratoria basal, tras practicar una maniobra de espiración forzada, como se explicó en el punto primero de la provocación con metacolina.

2º.- Se monitorizó la frecuencia cardíaca.

3º.- A continuación se sometió al niño a una carrera sobre el tapiz rodante, tratando que realizara un esfuerzo tal que alcanzara una frecuencia cardíaca del 80% de la máxima prevista para su edad. Para ello se varió la velocidad y la pendiente de la cinta, de acuerdo con el siguiente protocolo:

Paso	Tiempo	Talla	Velocidad	Inclinación
1º	2 minutos	todas	4 km/h	0%
2º	2 minutos	<160	4 km/h	6%
		>160	5 km/h	
3º	6 minutos	<160	6.6 km/h	6%
		>160	8.5 km/h	

4°.- Al minuto de finalizar el ejercicio se realizó una nueva prueba de función respiratoria, que se repitió cada 5 minutos hasta completar media hora.

5°.- Se observó si en cualquier momento se producía una caída de  $FEV_1$  respecto al valor inicial.

Por último se procedió a realizar un test de provocación bronquial con polen de Lolium. Para ello se utilizó un extracto de Lolium perenne liofilizado (Farmacia) que se reconstruyó con albúmina al 5%, el mismo día de su uso. La técnica empleada fue la siguiente (220):

1°.- Se obtenía una función respiratoria basal, según se ha explicado anteriormente en la provocación con metacolina.

2°.- Se administraban 5 inhalaciones del diluyente, según la técnica descrita en la provocación con metacolina.

3°.- Se esperaba 10 minutos y se realizaba una nueva función respiratoria. Si el  $FEV_1$  se mantenía por encima del 80% respecto al valor basal se continuaba la prueba, administrándose 5 inhalaciones de una dilución antigénica que contenía 10 U.B./ml de Lolium.

4°.- A los 10 minutos se realizaba de nuevo otra función respiratoria, y si no se observaba una caída del  $FEV_1$  superior al 20%, respecto al valor obtenido tras la inhalación del diluyente, se continuaba la prueba administrando en cada paso 5 inhalaciones de diluciones cada vez mas concentradas de antígeno (100, 1.000, 10.000 y 100.000 U.B./ml). Después de cada administración se esperaba 10 minutos y se repetía la maniobra de espiración forzada. La prueba se daba por concluida cuando se alcanzaba una caída del  $FEV_1$  superior al 20%, respecto del valor obtenido tras la inhalación del diluyente, o cuando se administraba la última concentración.

Si se producía una caída de la función respiratoria se administraba un  $\beta$ -adrenérgico inhalado y una dosis de corticoides orales, manteniéndose al niño en observación al menos 1 hora, hasta constatar la normalización clínica y funcional.

### **III.3.- Método estadístico**

Los datos obtenidos se introdujeron en un ordenador portátil Toshiba T1910 y se utilizó un programa estadístico SIGMA Plus (Horus Hardware) para realizar los cálculos.

La relación lineal entre las variables cuantitativas se estudió mediante el coeficiente de correlación..

Para comparar variables cualitativas usamos la prueba exacta de Fisher y el test de  $\chi^2$ , con la variante de Yates cuando las casillas tenían menos de 5 elementos.

Al comparar una variable cuantitativa con otra cualitativa de dos respuestas usamos la comparación de medias independientes. Si la variable cualitativa tenía mas de dos respuesta se empleo el análisis de la varianza (ANOVA).

También se procedió a calcular los índices de validez de cada prueba de provocación bronquial, y se construyeron las correspondientes curvas ROC.

### **III.4.- Búsqueda bibliográfica**

El análisis bibliográfico se realizó manualmente, utilizando en el Index Medicus, y mediante búsquedas por ordenador en las bases de datos IME y MEDLINE. Ambas se repitieron por última vez en Agosto de 1994.

## **IV. RESULTADOS**

Se analizaron 101 casos de pacientes polínicos, de los que 48 eran rinoconjuntivíticos y 53 presentaban, además, asma. La edad media, en el momento de la primera consulta, fue de 9.75 años, con un valor mínimo de 6 y uno máximo de 16. En cuanto al sexo, 65 eran varones (64.35%) y 36 mujeres (35.64%).

La edad media en que habían comenzado con los primeros síntomas de la enfermedad era de 7.22 años (SD 2.18), con un valor mínimo de 2 y uno máximo de 14. En 70 casos la sintomatología inicial había sido de rinoconjuntivitis. Veintidós de estos pacientes presentaron asma en los años siguientes. Lo mismo sucedió con 2 niños que debutaron con urticaria y que en años sucesivos sufrieron rinoconjuntivitis y asma. El tiempo medio que tardó en aparecer las sibilancias, después del comienzo de los síntomas rinoconjuntivales fue de 2 años, con un mínimo de 1 y un máximo de 6. En todos los asmáticos se asociaron síntomas rinoconjuntivales desde el principio. En el momento de la primera visita el tiempo medio de evolución de la enfermedad, para la rinoconjuntivitis, era de 2.86 años (SD 1.99), con un valor mínimo de 1 año y máximo de 12, mientras que para el asma era de 2.14 años (SD 2.02), con un valor mínimo de 1 y máximo de 12 años.

El 59% presentaba antecedentes familiares de alergia y el 49% de asma. Las manifestaciones alérgicas fueron más frecuentes entre las madres que entre los padres (15 frente a 8), así como el asma perenne no filiado (5 frente a 1). En cuanto a los antecedentes personales, el 23.7% tenía antecedentes de alergia (15% dermatitis atópica y 9% alergia alimentaria) y el 30.69% de asma (26% asma infeccioso, 10% asma de esfuerzo y 1 caso de sensibilización a ácaros). En el momento de la primera consulta el 11.88% presentaba lesiones de dermatitis atópica.

En lo que respecta al tabaco, comprobamos que en el 64% de los casos el padre, la madre o ambos fumaban más de 10 cigarrillos al día. No se demostró relación con los antecedentes de asma previo ni con la gravedad del mismo.

El análisis de los datos obtenidos se enfocó desde dos perspectivas:

**a.-** Detección de las diferencias clínicas y/o analíticas que pudieran existir entre los sujetos polínicos no asmáticos y asmáticos.

**b.-** Observación de los índices de validez para cada prueba de provocación bronquial y definición de las características de los sujetos que reaccionaran positivamente a cada una de ellas.

## **IV.1 Diferencias clínicas y/o analíticas entre rinoconjuntivíticos y asmáticos**

### **IV.1.1.- Datos recogidos en la primera consulta**

No se observaron diferencias significativas entre rinoconjuntivíticos y asmáticos respecto a la edad en el momento de la primera consulta, edad en que había comenzado la polinosis, tiempo de evolución de los síntomas, antecedentes personales de alergia, dermatitis atópica actual, antecedentes familiares de asma y/o alergia y presencia de padres fumadores.

En cuanto al sexo, se observó un predominio de varones entre el grupo de asmáticos:

<b>Sexo</b>			
	<b>NIÑOS</b>	<b>NIÑAS</b>	<b>p</b>
Rinoconjuntivitis	27	21	n.s.
Asma	38	15	p<0.05

Además, se vio que los asmáticos presentaban antecedentes personales de asma con mayor frecuencia que los rinoconjuntivíticos ( $\chi^2$  p<0.05):

<b>Antecedentes Personales de Asma</b>		
	<b>SI</b>	<b>NO</b>
Rinoconjuntivitis	9	39
Asma	22	31



Al tratar de analizar qué tipo de asma era el más frecuente no se observaron diferencias significativas respecto a la incidencia de asma en relación a procesos infecciosos respiratorios ni asma de esfuerzo entre los dos grupos. Solo un paciente había presentado asma por sensibilización a ácaros y pertenecía al grupo de los asmáticos.

#### IV.1.2.- Datos sobre el año previo a la primera consulta

No se observaron diferencias entre rinoconjuntivíticos y asmáticos respecto a la incidencia de rinitis fuera de la primavera y grado de conjuntivitis en dicha estación. Sin embargo, sí se apreció que los asmáticos presentaban con más frecuencia asma fuera de la primavera ( $\chi^2$   $p < 0.05$ ):

Asma fuera de la primavera		
	SI	NO
Rinoconjuntivitis	3	45
Asma	14	39

También se observó que los afectos de rinoconjuntivitis, exclusivamente, manifestaban síntomas nasales más intensos en la primavera ( $\chi^2$   $p < 0.05$ ):

Rinitis durante la primavera				
	NO	LEVE	MODERADA	SEVERA
Rinoconjuntivitis	1	1	18	28
Asma	2	11	16	24

#### IV.1.3.- Pruebas complementarias realizadas en la primera consulta

El 17% de nuestros pacientes presentaba elevación de los eosinófilos en sangre periférica y el 10.11% alguna anomalía en la radiografía de senos maxilares, no observándose diferencias significativas entre asmáticos y rinoconjuntivíticos respecto a estas dos pruebas.

En 90 casos se determinó la IgE total y se encontró que en el 45.55% estaba elevada, siendo este hecho mas frecuente entre los asmáticos (Fisher 0.02):

Niveles de IgE		
	ELEVADOS	NORMALES
Rinoconjuntivitis	16	30
Asma	25	19

No se pudo encontrar relación con los antecedentes familiares de alergia ni con los personales o familiares de asma, ni con el curso del asma en el último año, ni con la sintomatología rinoconjuntival en la última primavera, pero sí se pudo relacionar este aumento de IgE, producido fuera de la estación polínica, con la presencia de asma en la siguiente primavera ( $\chi^2$  p<0.05):

Asma durante la 2ª primavera		
	SI	NO
IgE normal	18	31
IgE elevada	25	16

En cuanto a la IgE específica frente a *Lolium* nos encontramos con que solo el 3.4% mostraba un RAST clase 1 o negativo, mientras que el 89.77% tenía un RAST clase 3 o 4. No se observaron diferencias significativas entre los grupos, ni ninguna relación con respecto a otros antecedentes o al curso clínico de la polinosis.

Mediante la realización de pruebas cutáneas pudimos observar que el 45.5% de los niños estaba sensibilizado a otros neumoaergenos (ácaros, hongos, epitelios, otros pólenes). Es de destacar que el polen de olivo era, con diferencia, el más frecuentemente implicado. El 36.63% del total de nuestros polínicos presentaba dicha sensibilización. Además, la polisensibilización se daba predominantemente en el grupo de los asmáticos ( $\chi^2$   $p < 0.05$ ):

<b>Pruebas cutáneas a otros alergen</b>		
	<b>PÓSITIVAS</b>	<b>NEGATIVAS</b>
Rinoconjuntivitis	17	31
Asma	34	24

El 41.85% de los polisensibilizados tenía antecedentes personales de asma frente al 23.63% de los pacientes monosensibilizados (Fisher  $p = 0.04$ ). Se encontró también una buena correlación con la cifra de IgE total: el 65% de los polisensibilizados tenía una IgE elevada, frente al 30% de los monosensibilizados ( $\chi^2$   $p < 0.01$ ).

En cuanto al resultado del prick-end no observamos ninguna diferencia entre los rinoconjuntivíticos y las asmáticos. Sin embargo, se constató que el 77.77% de los polisensibilizados respondió, con una pápula de 2 mm de diámetro, al emplear diluciones iguales o inferiores a 100 U.B./ml, mientras que eso solo sucedió en el 55.55% de los monosensibilizados ( $\chi^2$   $p < 0.05$ ).

La prueba de provocación conjuntival resultó positiva en todos los casos en que se practicó, salvo en dos niños asmáticos. No se observaron diferencias significativas entre los dos grupos, pero vimos que los pacientes que no habían respondido a la prueba, o que lo habían hecho con la dilución más concentrada, presentaron una sintomatología conjuntival más leve en primavera ( $\chi^2$   $p < 0.01$ ):

<b>Conjuntivitis durante la segunda primavera</b>		
	<b>NEGATIVA-LEVE</b>	<b>MODERADA-SEVERA</b>
Respuesta negativa o con 100.000 U.B / ml	39	20
Respuesta con $\leq 10.000$ U.B/ ml	15	26

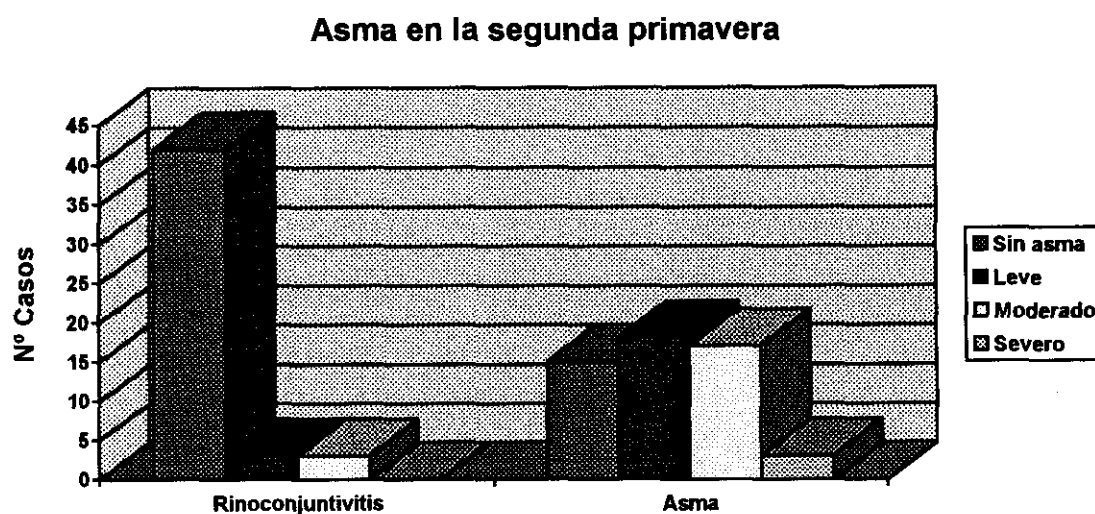
#### **IV.1.4.- Datos recogidos después de la primavera siguiente a la primera consulta**

No se observaron diferencias significativas respecto al grado de rinitis o conjuntivitis entre los dos grupos:

<b>Rinitis durante la segunda primavera</b>				
	<b>NO</b>	<b>LEVE</b>	<b>MODERADA</b>	<b>SEVERA</b>
Rinoconjuntivitis	3	12	23	10
Asma	5	14	18	16

<b>Conjuntivitis durante la segunda primavera</b>				
	NO	LEVE	MODERADA	SEVERA
Rinoconjuntivitis	4	23	16	5
Asma	8	20	13	12

Sin embargo, se observó que 6 de los pacientes inicialmente calificado como rinoconjuntivíticos presentaron sibilancias:



#### IV.1.5.- Datos recogidos después de la tercera primavera tras el diagnóstico

Después de la tercera primavera solo acudieron a revisión 94 pacientes. De ellos 44 pertenecían al grupo original de los rinoconjuntivíticos y 50 al de los asmáticos. Tanto unos como otros habían mejorado de su sintomatología, tanto en la primavera como fuera de ella. Es de resaltar que de los 50 originariamente asmáticos 22 no presentaron asma en primavera,

después de 3 años de inmunoterapia, mientras que de los 44 rinoconjuntivíticos primitivos 7 habían desarrollado asma a pesar de la inmunoterapia

### **1.- Rinitis fuera de la primavera**

a.- En el primer año (101 casos):

-Rinoconjuntivíticos (48 casos): 15 si, 33 no

-Asmáticos (53 casos): 14 si, 39 no

b.- En el tercer año (94 casos):

-Rinoconjuntivíticos (44 casos): 6 si, 38 no

-Asmáticos (50 casos): 10 si, 40 no

### **2.- Asma fuera de la primavera**

a.- En el primer año (101 casos):

-Rinoconjuntivíticos (48 casos): 45 no tuvieron asma, en 2 fue leve y en 1 moderado.

-Asmáticos (53 casos): 39 no tuvieron asma, en 12 fue leve y en dos moderado.

b.-En el tercer año (94 casos)

-Rinoconjuntivíticos (44 casos): 37 no tuvieron asma, en 4 fue leve y en 3 moderado

-Asmáticos (50 casos): 22 no tuvieron asma, en 17 fue leve, en 10 moderado y en 1 severo.

### **3.- Rinitis durante la primavera**

a.-En el primer año (101 casos):

-Rinoconjuntivíticos (48 casos): 1 no tuvo rinitis, en 1 fue leve, en 18 moderada y en 28 severa.

-Asmáticos (53 casos): 2 no tuvieron rinitis, en 11 fue leve, en 16 moderada y en 24 severa.

b.-En el tercer año (94 casos):

-Rinoconjuntivíticos (44 casos): 4 no tuvieron rinitis, en 25 fue leve, en 10 moderada y en 5 severa.

-Asmáticos (50 casos): 5 no tuvieron rinitis, en 26 fue leve, en 14 moderada y en 5 severa.

#### **4.- Conjuntivitis durante a primavera**

a.-En el primer año (101 casos):

-Rinoconjuntivíticos (48 casos): 1 no tuvo síntomas, en 4 fueron leves, en 11 moderados y en 32 severos.

-Asmáticos (53 casos): 4 no tuvieron síntomas, en 5 fueron leves, en 11 moderados y en 33 severos.

b.-En el tercer año (94 casos):

-Rinoconjuntivíticos (44 casos): 11 no tuvieron conjuntivitis, en 21 fue leve, en 8 moderada y en 4 severa.

-Asmáticos (50 casos): 13 no tuvieron conjuntivitis, en 24 fue leve, en 7 moderada y en 6 severa.

#### **5.- Asma durante la primavera**

a.-En el primer año (101 casos):

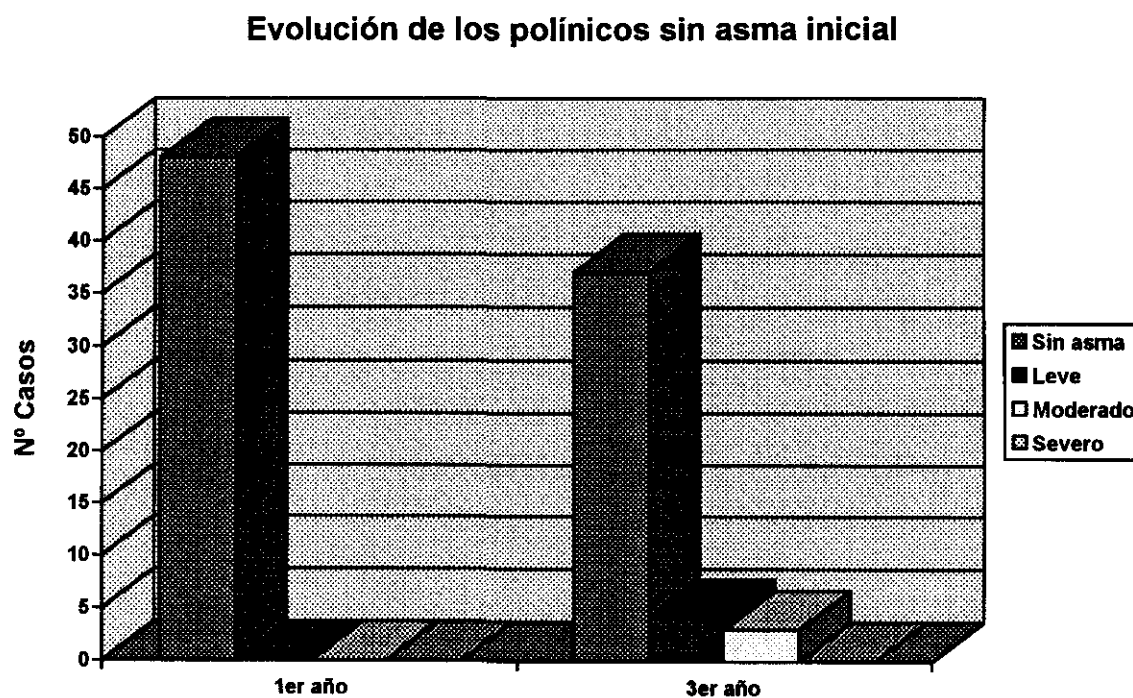
-Rinoconjuntivíticos (48 casos): ninguno tuvo asma.

-Asmáticos (53 casos): 2 no habían tenido asma esa última primavera, en 16 fue leve, en 11 moderado y en 33 severo.

b.-En el tercer año (94 casos):

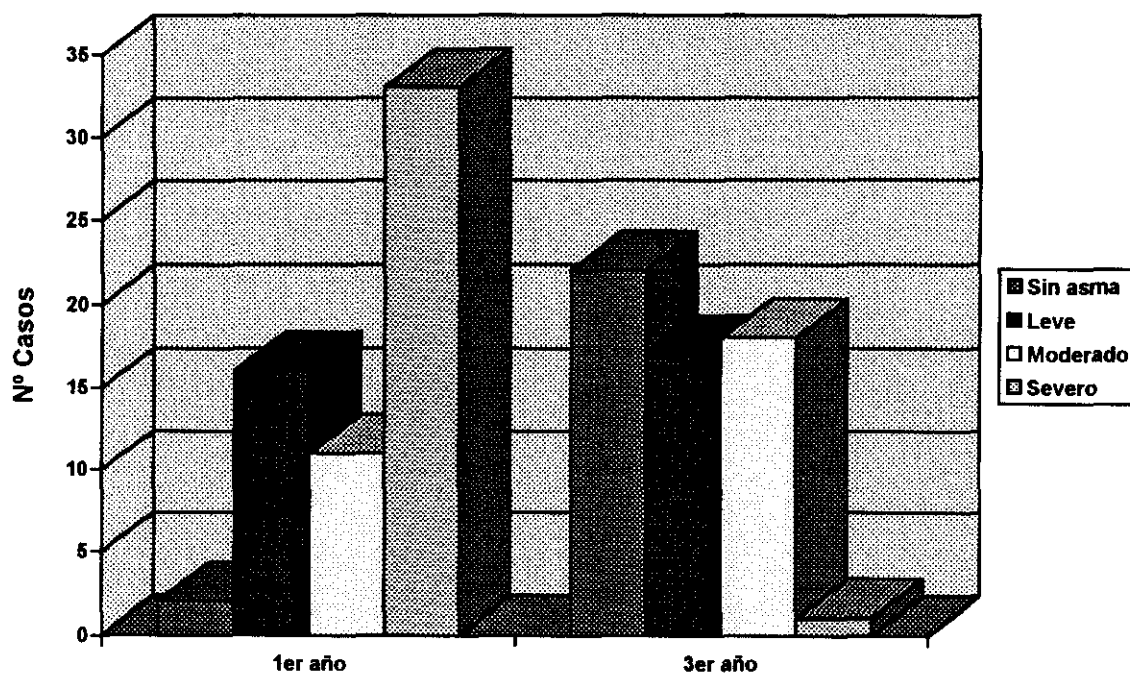
-Rinoconjuntivíticos (44 casos): 37 no tuvieron asma, en 4 fue leve y en 3 moderado.

-Asmáticos (50 casos): 22 no tuvieron asma, en 17 fue leve, en 18 moderado y en 1 severo.





## Evolución de los niños asmáticos



## **IV.2.- Resultados e índices de validez de las pruebas de provocación bronquial**

### **IV.2.1.- Provocación bronquial con metacolina**

Se realizó una primera prueba de provocación bronquial con metacolina, en el momento del diagnóstico, a 101 pacientes. Se obtuvieron 45 resultados positivos, cuya media fue de 101.13 U.A. (SD 84.07), con un valor mínimo de 3.5 y otro máximo de 340. De ellas 7 fueron positivas con 201-400 U.A. (6.93%), 23 con 51-200 U.A. (22.71%) y 15 50 o menos U.A. (14.85%). No se encontraron diferencias significativas respecto al diagnóstico. La media de las metacolinas positivas entre los 23 rinoconjuntivíticos respondedores fue de 106.85 (SD 43.56), mientras que entre los 22 asmáticos fue de 95.13 (SD 74.63). La distribución fue la siguiente:

<b>1ª Prueba de metacolina</b>		
	<b>RINOCONJUNTIVITIS</b>	<b>ASMA</b>
Metacolina Negativa	25	31
PD <sub>20</sub> : 201-400 U.A.	4	3
PD <sub>20</sub> : 51-200 U.A.	13	10
PD <sub>20</sub> : ≤ 50 U.A.	6	9

Así mismo se realizó una segunda prueba de provocación con metacolina, después de tres años de seguimiento, a 45 pacientes. La metacolina media fue de 82.52 (SD 69.81), con un valor mínimo de 9 y otro máximo de 250 U.A.. Tampoco se encontraron diferencias significativas respecto al diagnóstico. La metacolina media entre las rinoconjuntivitis respondedoras fue de 108.22 U.A. (SD 71) y entre los asmáticos de 66 U.A. (SD 66.02),

diferencias que no fueron significativas desde el punto de vista estadístico. La distribución fue la siguiente:

<b>2ª Prueba de metacolina</b>		
	<b>RINOCONJUNTIVITIS</b>	<b>ASMA</b>
Metacolina Negativa	12	9
PD <sub>20</sub> : 201-400 U.A.	0	3
PD <sub>20</sub> : 51-200 U.A.	9	3
PD <sub>20</sub> : ≤ 50 U.A.	1	8

Comparando las metacolinas primeras con estas segundas nos encontramos con que un 30% no había variado de categoría, independientemente del diagnóstico y del estado clínico del paciente. No se encontraron diferencias significativas entre la media de las dos pruebas.

#### 1º.- Indices de validez

Se realizaron cálculos sobre la sensibilidad y especificidad de la primera prueba de provocación con metacolina, con el siguiente resultado:

a.-Punto de corte en 50 U.A.:

-sensibilidad = 0.16

-especificidad = 0.87

b- Punto de corte en 100 U.A.

-sensibilidad = 0.24

-especificidad = 0.66

c- Punto de corte en 200 U.A.

-sensibilidad = 0.35

-especificidad = 0.6

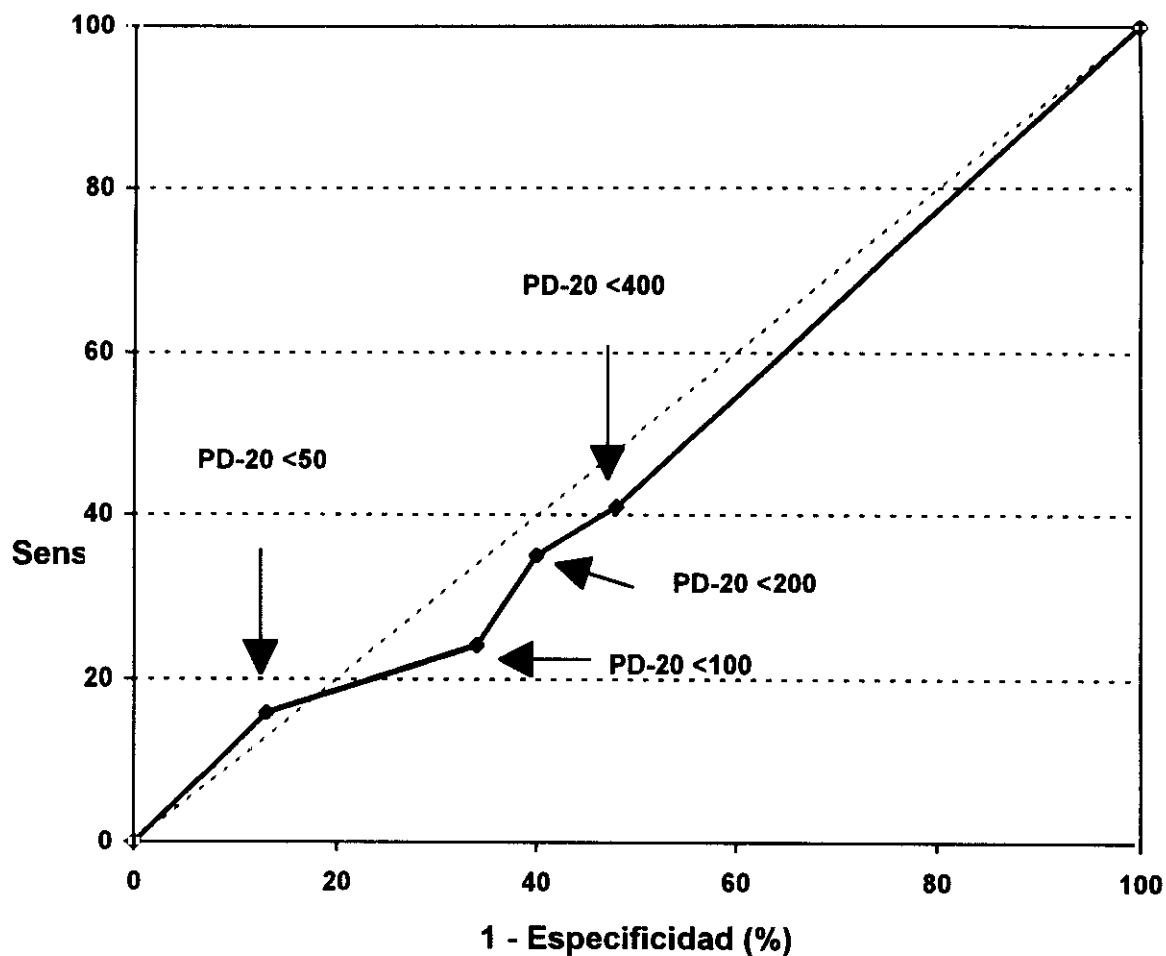
d- Punto de corte en 400 U.A.

-sensibilidad = 0.41

-especificidad = 0.52

Como vemos la primera prueba de provocación con metacolina resultó poco útil para discriminar ente asmáticos y rinoconjuntivíticos. Esto se aprecia mejor en la correspondiente curva ROC en la que se aprecia su situación cercana a la diagonal principal:

### Primera provocación bronquial con metacolina



Se realizaron los mismos cálculos con la segunda prueba de provocación con metacolina y los diagnósticos que en aquel momento presentaban los enfermos. Nos encontramos con los siguientes resultados:

a.-Punto de corte en 50 U.A.

-sensibilidad = 0.34

-especificidad = 0.95

b- Punto de corte en 100 U.A.

-sensibilidad = 0.47

-especificidad = 0.72

c.-Punto de corte en 200 U.A.

-sensibilidad = 0.47

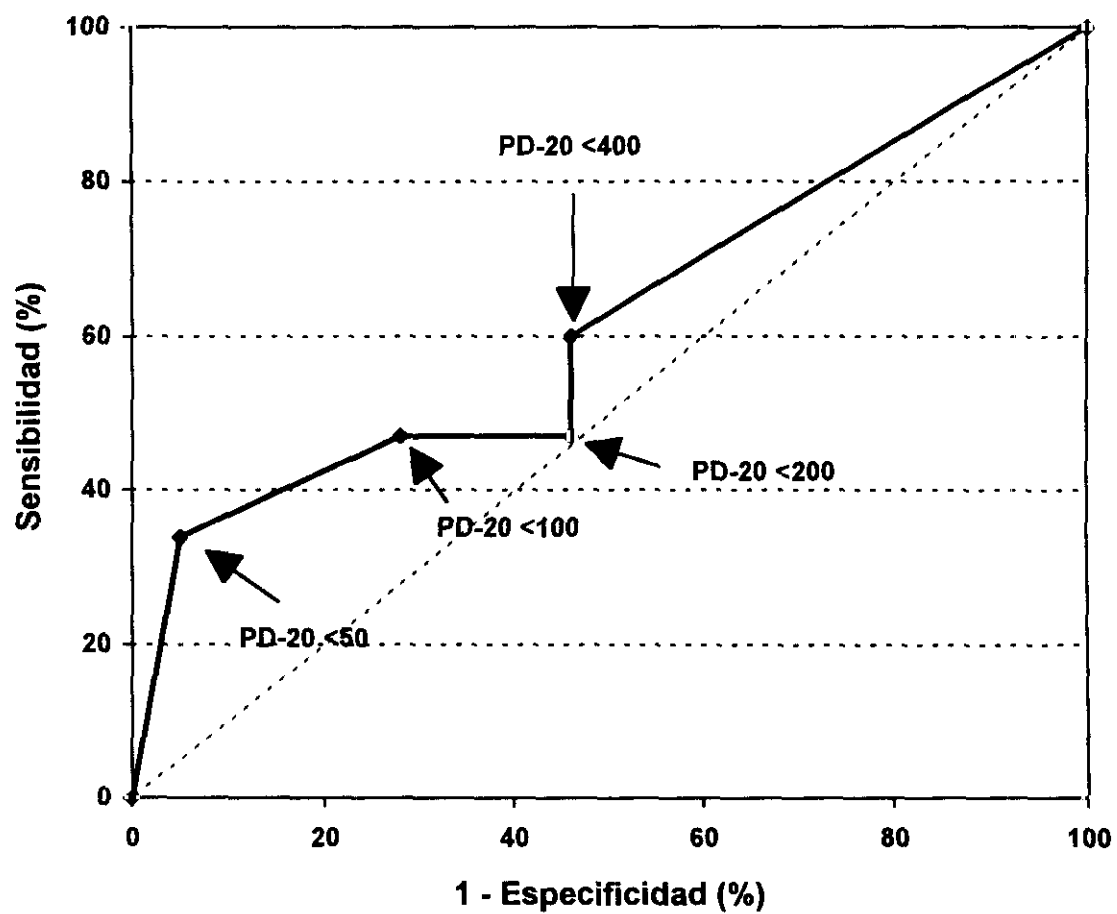
-especificidad = 0.54

d.-Punto de corte en 400 U.A.

-sensibilidad = 0.60

-especificidad = 0.54

Como se ve, en esta segunda prueba de provocación había mejorado algo su rentabilidad, especialmente respecto a la especificidad en el punto de corte de 50 U.A., lo que queda mejor reflejado en la correspondiente curva ROC en que se aprecia una mayor cercanía al lado izquierdo y superior del gráfico:

**Segunda provocación bronquial con metacolina**

## 2.- Datos recogidos en la primera consulta

No se encontraron diferencias significativas respecto al sexo, edad en la primera consulta, edad en que había comenzado la polinosis, forma de comienzo de la misma, años de evolución de la rinoconjuntivitis o del asma, antecedentes familiares de alergia y padres fumadores, tanto con la primera prueba de metacolina como con la segunda..

Con la primera prueba se comprobó que los sujetos que respondían a la metacolina (menos de 200 U.A.) presentaban con más frecuencia antecedentes personales de alergia ( $\chi^2$   $p < 0.05$ ) :

Antecedentes personales de alergia			
	D. ATOPICA	A. ALIMENTOS	NEGATIVOS
Metacolina negativa	6	4	45
PD <sub>20</sub> : 201-400 U.A.	0	1	6
PD <sub>20</sub> : 51-200 U.A.	2	2	19
PD <sub>20</sub> : ≤ 50 U.A.	7	2	6

Analizando más detenidamente estos resultados se encontró que la correlación se cumplía, de una forma mas acusada, entre los antecedentes de dermatitis atópica y el punto de corte para metacolina de 50 U.A. ( $\chi^2$   $p < 0.001$ ):

Antecedentes personales de alergia		
	D. ATOPICA	NEGATIVOS
PD <sub>20</sub> : ≥ 51 U.A.	8	70
PD <sub>20</sub> : ≤ 50 U.A.	7	6

Además, los 14 sujetos respondedores con antecedentes personales de alergia presentaban una metacolina media de 57.92 U.A. (SD 60.18), mientras que los 31 que no tenían dichos antecedentes mostraban una metacolina media de 120.64 U.A. (SD86.79). Estas diferencias eran estadísticamente significativas (C.M.I.  $p<0.05$ ).

Entre los pacientes que continuaban presentando dermatitis atópica en el momento de la primera consulta, la respuesta positiva a la metacolina también era más acusada ( $\chi^2$   $p<0.05$  cuando el punto de corte estaba en 200 U.A. y  $p<0.001$  cuando el punto de corte se situaba en 50 U.A.):

<b>Dermatitis atópica en la 1ª consulta</b>		
	SI	NO
Metacolina negativa	3	53
PD <sub>20</sub> : 201-400 U.A.	0	7
PD <sub>20</sub> : 51-200 U.A.	2	21
PD <sub>20</sub> : ≤ 50 U.A.	7	8

Igualmente, los 9 individuos con dermatitis atópica respondedores a la metacolina tenían una metacolina media de 43.27 U.A. (SD 34.84), mientras que los respondedores pero sin dermatitis atópica mostraban una metacolina media de 115.59 U.A. (SD 86.79), lo que también era estadísticamente significativo (C.M.I.  $p<0.001$ ).

En cuanto a los antecedentes personales de asma en general se vio, con la primera prueba, que la metacolina media entre los que los presentaban era de 84.88 U.A. (SD 69.45) y entre los que no era de 111 U.A. (SD 91.62). Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Tampoco se hallaron diferencias respecto a la incidencia de asma en relación a procesos infecciosos respiratorios ni a asma de esfuerzo.



<b>Antecedentes personales de asma</b>		
	SI	NO
Metacolina negativa	14	42
PD <sub>20</sub> : 201-400 U.A.	2	5
PD <sub>20</sub> : 51-200 U.A.	10	13
PD <sub>20</sub> : ≤ 50 U.A.	5	10

En cuanto a los antecedentes familiares de asma se obtuvieron los siguientes resultados con la primera prueba de metacolina:

<b>Antecedentes familiares de asma</b>			
	1 <sup>er</sup> GRADO	2 <sup>o</sup> GRADO	NEGATIVOS
Metacolina negativa	16	9	31
PD <sub>20</sub> : 201-400 U.A.	0	4	3
PD <sub>20</sub> : 51-200 U.A.	7	6	10
PD <sub>20</sub> : ≤ 50 U.A.	6	1	7

No se observaron diferencias clara entre los grupos, pero cuando se analizaron la media de las metacolinas en cada uno se vio que la de los individuos con antecedentes de asma en primer grado era 57.84 U.A. (SD 40.26), la de los sujetos con antecedentes familiares en segundo grado era de 135.36 U.A. (SD 88.36) y la de los que carecía de dichos antecedentes de 113.25 U.A.(SD 94.39). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con antecedentes de asma en primer grado y los otros grupos (C.M.I.  $p < 0.05$ ).

### 3.- Datos sobre el año previo a la primera consulta

Tanto con la primera prueba de provocación como con la segunda no se encontró ninguna relación con la presencia de asma en el último año fuera de la primavera, rinitis perenne o grado de rinitis, conjuntivitis o asma durante la primavera.

### 4.- Relación con las pruebas complementarias realizadas

No se encontró ninguna relación entre la primera prueba de provocación con metacolina y las pruebas in vitro realizadas ( eosinófilos circulantes, niveles de IgE y RAST a Lolium ) y radiografía de senos, así como tampoco con casi ninguna de las pruebas in vivo (positividad de las pruebas cutáneas a otros alérgenos, grado de positividad con la prueba de prick-end y prueba de provocación bronquial con ejercicio físico).

Se observó una correlación positiva entre la primera prueba de provocación con metacolina y la provocación bronquial con Lolium, que detallaremos más adelante.

### 5.- Datos recogidos en la primavera siguiente a la primera consulta

Se encontró que los sujetos que habían respondido con menos de 50 U.A. de metacolina presentaban más frecuentemente asma moderado o severo en la siguiente primavera ( $\chi^2$  p<0.05):

Asma durante la segunda primavera		
	MODERADO-SEVERO	NO
Metacolina negativa	8	33
PD <sub>20</sub> : ≤ 50 U.A.	8	5

### 6.- Datos recogidos después de la tercera primavera

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la segunda prueba de metacolina realizada, después de tres años de seguimiento, y la presencia de asma en el último año, fuera de la primavera, rinitis perenne o grado de rinitis o conjuntivitis durante la primavera. Si se encontró con la presencia de asma en la última primavera, situando el punto de corte en 50 U.A. ( $\chi^2$   $p < 0.05$ ):

Asma durante la tercera primavera			
	NO	LEVE	MODERADO
Metacolina negativa	12	8	1
PD <sub>20</sub> : 201-400 U.A.	0	1	2
PD <sub>20</sub> : 51-200 U.A.	9	1	2
PD <sub>20</sub> : ≤ 50 UA	1	4	4

Asma durante la tercera primavera		
	SI	NO
PD <sub>20</sub> : ≥ 51 U.A.	15	21
PD <sub>20</sub> : ≤ 50 U.A.	8	1

Después de tres años de seguimiento acudieron al control 94 niños ( 44 eran originalmente rinoconjuntivíticos y 50 asmáticos ). De los 44 que inicialmente se habían diagnosticado de rinoconjuntivitis 7 había evolucionado a asma. La prueba de metacolina realizada en el momento del diagnóstico había sido positiva en 3 de ellos, mientras que de los

37 que seguían presentando solo rinoconjuntivitis habían respondido 15 con la misma prueba. Estos resultados no mostraron ninguna significación estadística:

<b>1ª Prueba de metacolina</b> <i>(Evolución a los 3 años de los rinoconjuntivíticos iniciales)</i>		
	RC → RC	RC → ASMA
PD <sub>20</sub> : ≥ 201 U.A.	22	4
PD <sub>20</sub> : ≤ 200 U.A.	15	3

De los 50 niños diagnosticados de asma en la primera visita, y que acudieron al control a los tres años, 28 seguían presentando sibilancias en primavera y 22 estaban asintomáticos. Quince pacientes del primer grupo y 16 del segundo habían respondido negativamente con la primera prueba de metacolina. Tampoco se observaron diferencias significativas:

<b>1ª Prueba de metacolina</b> <i>(Evolución a los tres años de los asmáticos iniciales)</i>		
	ASMA → ASMA	ASMA → RC
PD <sub>20</sub> : ≥ 201 U.A.	15	16
PD <sub>20</sub> : ≤ 200 U.A.	13	6

#### IV.2.2.- Prueba de provocación con ejercicio físico

En la primera visita se realizó una prueba de provocación con ejercicio físico a 98 niños. No se observaron diferencias entre los rinoconjuntivíticos y los asmáticos:

<b>1º Provocación con ejercicio</b>		
	<b>RINOCONJUNTIVITIS</b>	<b>ASMA</b>
Prueba negativa	35	37
Caída FEV <sub>1</sub> : 10-14%	4	6
Caída FEV <sub>1</sub> : 15-19%	4	5
Caída FEV <sub>1</sub> : $\geq 20\%$	3	4

### 1.- Indices de validez

Los índices de validez a diferentes cortes de la caída del FEV<sub>1</sub> fueron los siguientes:

a.-Punto de corte en caída de FEV<sub>1</sub>  $> \text{ó} = 20\%$

-Sensibilidad = 0.07

-Especificidad = 0.93

b.-Punto de corte en caída de FEV<sub>1</sub> 15-19%

-Sensibilidad = 0.17

-Especificidad = 0.84

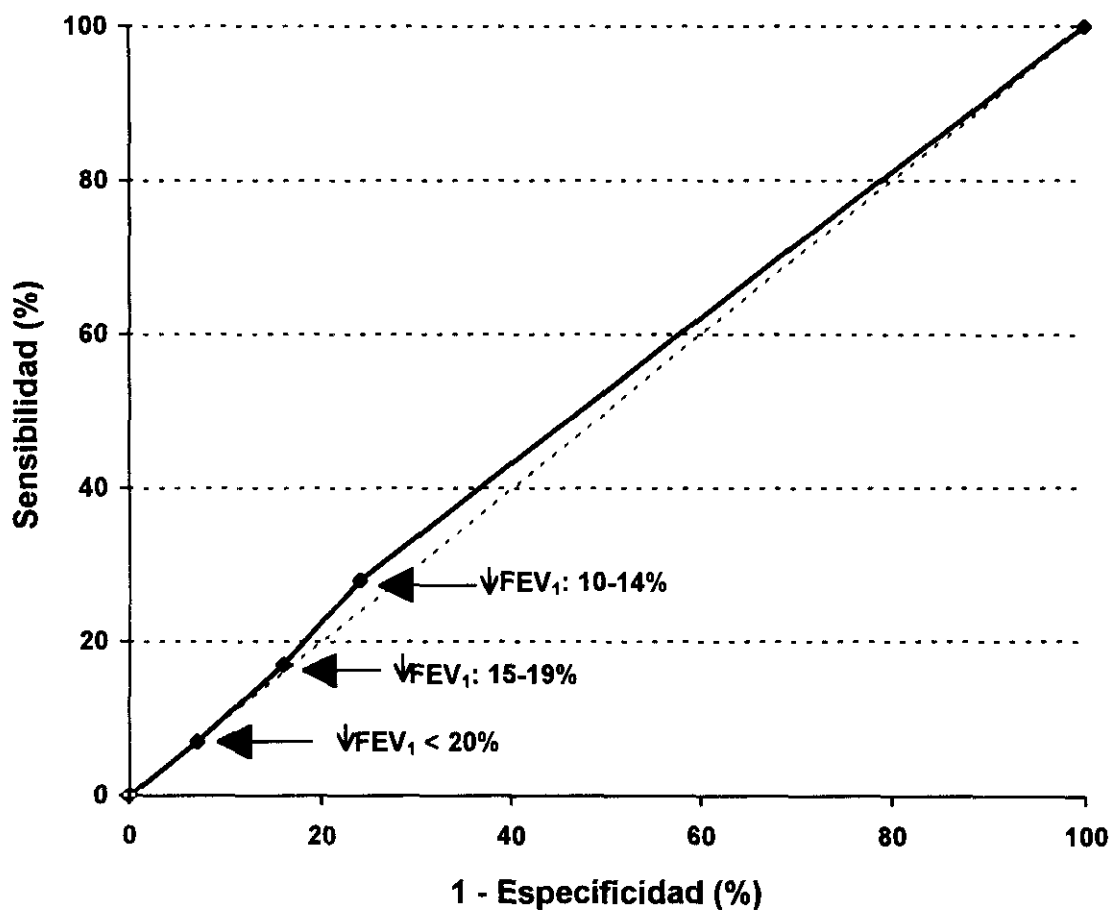
c.-Punto de corte en caída de FEV<sub>1</sub> 10-14%

-Sensibilidad = 0.28

-Especificidad = 0.76

Como se puede apreciar en la siguiente curva ROC la primera prueba de provocación con ejercicio físico no resultó útil:

### Primera provocación bronquial con ejercicio



Al cabo de tres años de seguimiento se repitió la prueba de provocación en 50 pacientes, encontrándose solo uno en el que el FEV<sub>1</sub> cayó por debajo del 20%:

2ª Provocación con ejercicio		
	RINOCONJUNTIVITIS	ASMA
Prueba negativa	22	20
Caída FEV <sub>1</sub> : 10-14%	2	2
Caída FEV <sub>1</sub> : 15-19%	0	3
Caída FEV <sub>1</sub> : ≥ 20%	0	1

Se procedió a calcular los índices de validez y se obtuvieron los siguientes resultados:

a.-Punto de corte en caída de  $FEV_1 > 6 = 20\%$

-Sensibilidad = 0.03

-Especificidad = 1

b.-Punto de corte en caída de  $FEV_1$  15-19%

-Sensibilidad = 0.15

-Especificidad = 1

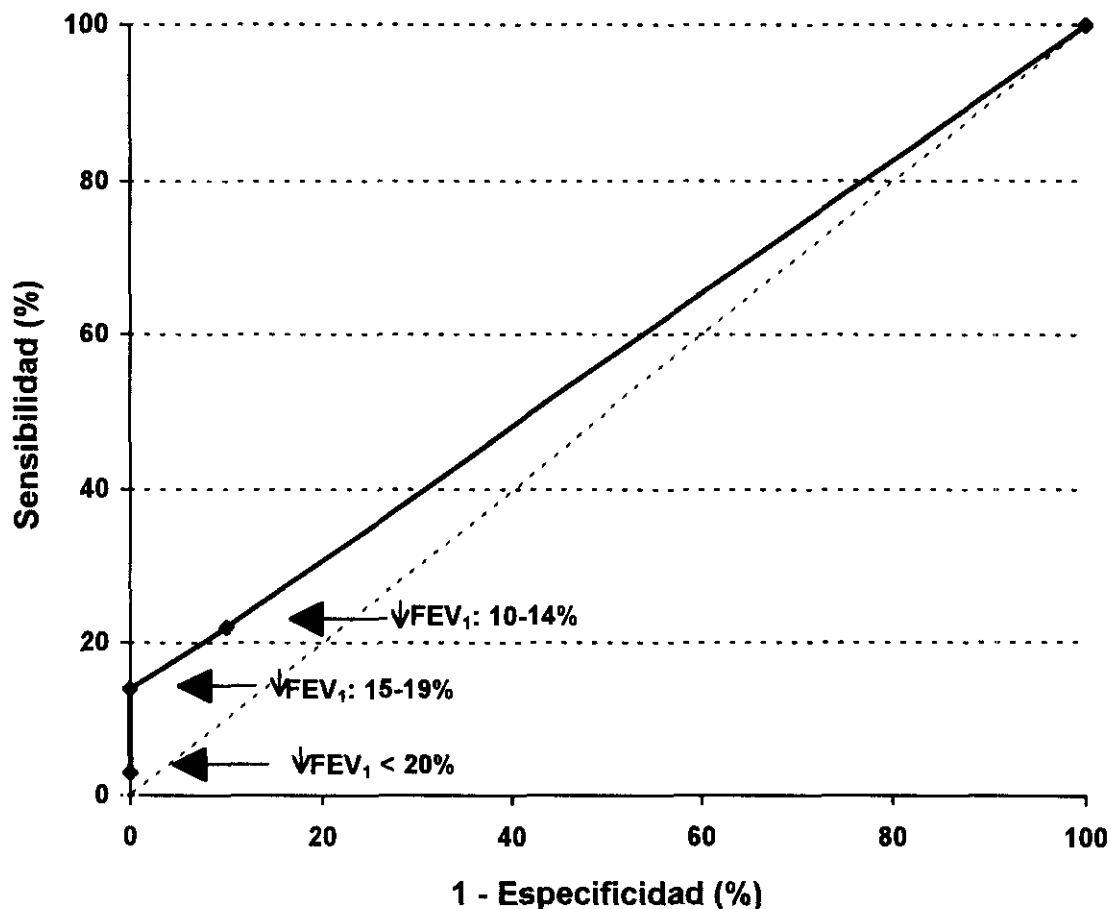
c.-Punto de corte en caída de  $FEV_1$  10-14%

-Sensibilidad = 0.23

-Especificidad = 0.9

Como puede apreciarse en la siguiente curva ROC habían mejorado los índices de validez de la prueba, especialmente en lo referente a la especificidad, probablemente porque ahora se estaba midiendo mas la verdadera hiperreactividad intrínseca del sujeto, una vez tratado su problema alérgico con los tres años de inmunoterapia.

### Segunda provocación bronquial con ejercicio



#### 2.- Datos recogidos en la primera consulta

No se encontraron diferencias significativas respecto al sexo, edad en el momento de la primera consulta, edad en que había comenzado la polinosis, forma de comienzo de la enfermedad, años de evolución de la clínica de rinoconjuntivitis o de asma, antecedentes personales o familiares de alergia, presencia de dermatitis atópica, antecedentes familiares de asma o presencia de padres fumadores. Sí se pudo comprobar que los niños que presentaban antecedentes clínicos de asma de esfuerzo respondían positivamente a la prueba de esfuerzo, con una caída de FEV<sub>1</sub> igual o superior al 20% ( $\chi^2$   $p < 0.05$ ):



<b>Antecedentes de asma de esfuerzo</b>		
	SI	NO
Caída FEV <sub>1</sub> : < 20%	7	84
Caída FEV <sub>1</sub> : ≥ 20%	3	4

### 3.- Datos sobre el año previo a la primera consulta

Con la primera prueba de provocación no se pudo encontrar ninguna relación con la presencia de rinitis o asma perenne, grado de rinoconjuntivitis o asma durante la primavera.

### 4.- Relación con las pruebas complementarias realizadas

No se encontró correlación alguna entre los resultados obtenidos con la primera prueba y los test complementarios realizados tanto in vitro como in vivo, incluyendo las provocaciones con metacolina y con lolium.

### 5.- Datos recogidos en la primavera siguiente a la primera consulta

No hubo relación entre los resultados de la primera prueba y el grado de afectación rinoconjuntival o asmática durante la segunda primavera.

### 6.- Datos recogidos después de la tercera primavera

Con las segunda prueba de provocación con esfuerzo físico se encontró que aquellos que seguían presentando asma fuera de la primavera respondían positivamente a la prueba de esfuerzo mas frecuentemente que los que no manifestaban estos antecedentes (Fisher p 0.05)

<b>Asma fuera de la primavera</b> <i>(tercer año)</i>		
	SI	NO
Caída FEV <sub>1</sub> : < 15%	8	36
Caída FEV <sub>1</sub> : ≥ 15%	3	1

También se comprobó una buena correlación con la gravedad del asma durante la primavera ( $\chi^2$   $p < 0.01$ )

<b>Asma durante tercera primavera</b>		
	MODERADO-SEVERO	NO-LEVE
Caída FEV <sub>1</sub> : < 15%	3	37
Caída FEV <sub>1</sub> : ≥ 15%	3	1

Ninguno de los que no tuvo asma durante la última primavera respondió a la prueba de esfuerzo.

La prueba de provocación con ejercicio físico tampoco nos ayudó a predecir que niños con rinoconjuntivitis iban a desarrollar asma. De los 36 casos inicialmente diagnosticados de rinoconjuntivitis, y que al cabo de tres años solo presentaban esa sintomatología, 5 habían respondido a la prueba de esfuerzo, mientras que de los 7 que desarrollaron asma solo 1 lo hizo:

<b>1º Provocación con ejercicio</b> <i>(Evolución a los tres años de los rinoconjuntivíticos iniciales)</i>		
	RC → RC	RC → ASMA
Caída FEV <sub>1</sub> : < 15%	31	5
Caída FEV <sub>1</sub> : ≥ 15%	5	1

En cuanto a los niños inicialmente asmáticos, que continuaron como tal al cabo de los tres años, 7 habían respondido a la prueba inicial y 20 no. Entre los que habían quedado asintomáticos sólo 2 lo habían hecho:

<b>1º Provocación con ejercicio</b> <i>(Evolución a los tres años de los asmáticos iniciales)</i>		
	ASMA → ASMA	ASMA → RC
Caída FEV <sub>1</sub> : < 15%	20	20
Caída FEV <sub>1</sub> : ≥ 15%	7	2

**IV.2.3.- Resultados de la prueba de provocación bronquial con Lolium**

En el momento del diagnóstico se realizó, en 101 pacientes, una prueba de provocación bronquial con Lolium. Esta resultó positiva en 31 casos, no observándose diferencias significativas entre rinoconjuntivíticos y asmáticos:

Provocación con Lolium		
	RINOCONJUNTIVITIS	ASMA
Prueba negativa	33	37
Caída con 100.000 UB	11	9
Caída con 10.000 UB	2	6
Caída con $\leq 1.000$ UB	2	1

**1.- Indices de validez**

Se realizaron los cálculos sobre los índices de validez de la prueba y se obtuvieron los siguientes resultados:

**a.-Corte en 1.000 U.B.**

-Sensibilidad = 0.018

-Especificidad = 0.95

**b.-Corte en 10.000 U.B.**

-Sensibilidad = 0.13

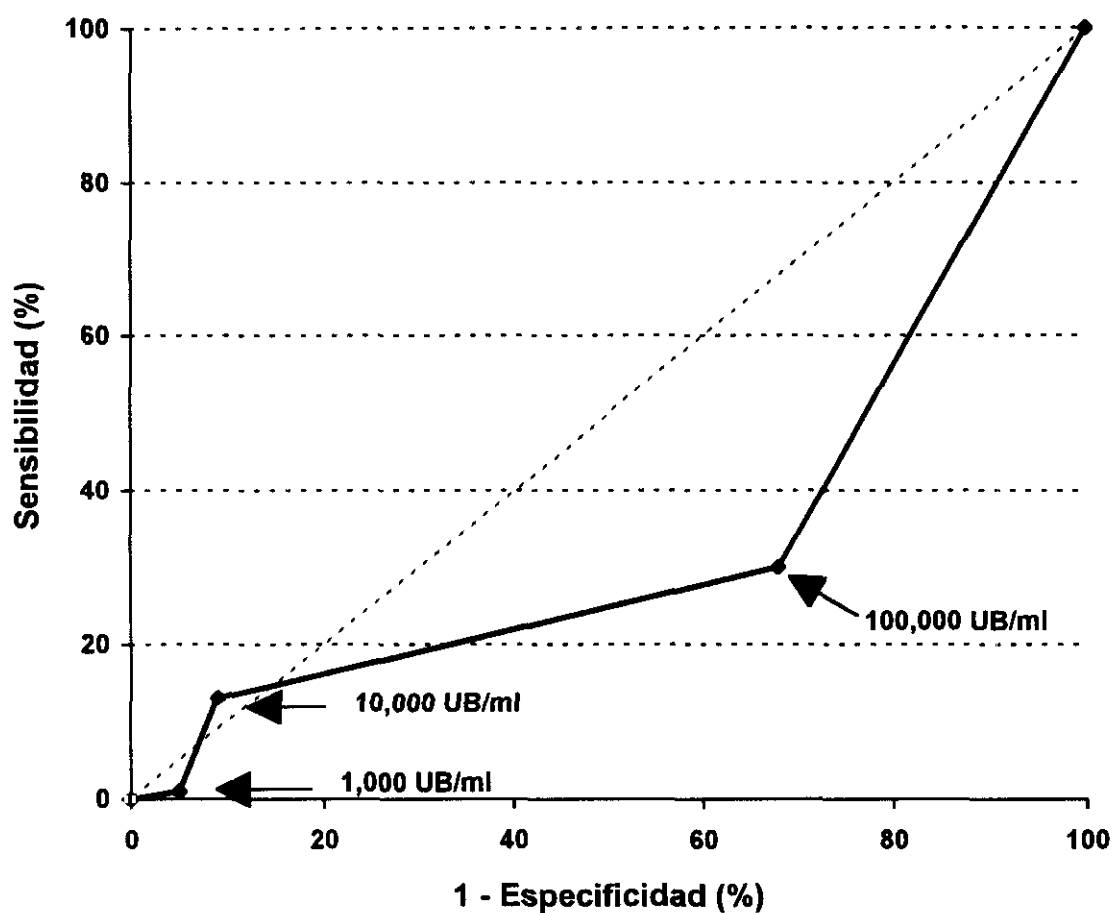
-Especificidad= 0.91

c.-Corte en 100.000 U.B.

-Sensibilidad = 0.30

-Especificidad = 0.32

### Provocación bronquial con Lolium



Como puede apreciarse en la correspondiente curva ROC la prueba resultó poco útil:

## 2.- Datos recogidos en la primera visita

No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la edad en la primera consulta, sexo, edad de comienzo de la polinosis, años de evolución de la rinoconjuntivitis o del asma, forma de comienzo de la enfermedad, antecedentes familiares de alergia o de asma, presencia de dermatitis atópica o de padres fumadores.

Se encontró relación entre la respuesta positiva con la prueba de provocación con Lolium (punto de corte en 10.000 U.B.) y los antecedentes de asma de esfuerzo en el último año ( $\chi^2$   $p < 0.01$ ):

<b>Antecedentes de asma de esfuerzo</b>		
	<b>POSITIVOS</b>	<b>NEGATIVOS</b>
Negativa ó 100.000 UB	6	84
Caída con $\leq$ 10.000 UB	4	7

También se encontró relación entre la respuesta positiva a la provocación con Lolium (punto de corte en 100.000 U.B.) y el mayor número de antecedentes personales de alergia, (dermatitis atópica pero no alergia a alimentos). La diferencia era estadísticamente significativa ( $\chi^2$   $p < 0.001$ )

<b>Antecedentes personales de alergia</b>		
	<b>POSITIVOS</b>	<b>NEGATIVOS</b>
Negativa	11	59
Caída con $\leq$ 100.000 UB	13	18

Así mismo se correlacionó el resultado de la prueba de provocación bronquial con Lolium y la presencia de dermatitis atópica, cuando el punto de corte se realizaba a 100.000 UB ( $\chi^2$   $p < 0.05$ ) y con el punto de corte a 10.000 UB ( $\chi^2$   $p < 0.001$ ):

Presencia de dermatitis atópica		
	SI	NO
Negativa	4	66
Caída con $\leq 100.000$ UB	8	23
Presencia de dermatitis atópica		
	SI	NO
Negativa ó 100.000 UB	6	84
Caída con $\leq 10.000$ UB	6	5

### 3.- Datos sobre el último año previo a la consulta

Se encontró correlación entre la prueba de provocación bronquial con Lolium (punto de corte en 10.000 U.B.) y la presencia de asma en el último año ( $\chi^2$   $p < 0.01$ )

Asma en el año previo a la 1ª consulta		
	LEVE-MODERADO	NO
Negativa ó 100.000 UB	11	79
Caída con $\leq 10.000$ UB	6	5

También se encontró correlación entre la respuesta a la provocación bronquial antigénica (punto de corte en 10.000 UB) y el grado de severidad del asma en la última primavera ( $\chi^2$   $p < 0.01$ )

Asma en la primavera previa a la primera consulta		
	SEVERO	NO
Negativa	2	33
Caída con $\leq 10.000$ UB	4	4

#### 4.- Relación con las pruebas complementarias realizadas

No se encontró correlación con ninguna de los test efectuados, tanto in vitro como in vivo, salvo con la prueba de provocación con metacolina, como ya se dijo. La correlación se establecía cuando el punto de corte era de 100.000 U.B. de Lolium, tanto para un punto de corte de metacolina de 50 U.A. como de 200 U.A. ( $\chi^2$   $p < 0.01$ ).

Relación P. con metacolina - P. con Lolium				
	Negativa	201-400 U.A.	51-200 U.A.	<50 U.A.
Negativa	45	6	14	5
100.000 U.B.	7	1	7	5
10.000 U.B.	4	0	2	2
1.000 U.B.	0	0	0	3



### 5.- Datos recogidos en la primavera siguiente a la primera consulta

Se observó que los pacientes que habían respondido positivamente a la prueba de provocación con Lolium (punto de corte en 100.000 U.B.) tenían con mas frecuencia asma moderado o severo en la siguiente primavera ( $\chi^2$  p< 0.01):

Asma durante la segunda primavera		
	MODERADO-SEVERO	NO
Prueba negativa	6	44
Caída con $\leq$ 100.000 UB	14	15

### 6.- Datos recogidos después de la tercera primavera

No se encontró relación con la presencia de rinitis o asma perennes o grado de rinoconjuntivitis durante la primavera.

Sí se observó que los niños que habían respondido positivamente a la provocación bronquial con Lolium, realizada al diagnóstico, presentaban más frecuentemente asma moderado-severo que los que no habían respondido ( punto de corte en 100.000 U.B./ml Fisher p 0.03 ; punto de corte en 10.000 U.B./ml  $\chi^2$  p<0.001):

Asma durante la tercera primavera			
	NO	LEVE	MODERADO-SEVERO
Prueba negativa	33	15	6
Caída = 100.000UB	11	5	3
Caída $\leq$ 10.000UB	5	0	6

La prueba de provocación bronquial con Lolium nos ayudó poco a predecir el curso clínico de la polinosis. De los 37 rinoconjuntivíticos, que seguían siéndolo al cabo de los tres años de seguimiento, habían respondido negativamente a la prueba 26, mientras que de los 7 que habían evolucionado a asma, 3 tampoco habían hecho respondedido:

<b>Provocación con Lolium</b> <i>(Evolución a los 3 años de los rinoconjuntivíticos iniciales)</i>		
	RC → RC	RC → ASMA
Prueba negativa	26	3
Caída con 100.000 U.B.	7	4
Caída con 10.000 U.B.	2	0
Caída con 1.000 U.B.	2	0

En cuanto a los asmáticos que estaban asintomáticos a los tres años, 17 no habían respondido a la provocación bronquial antigénica en el momento del diagnóstico. Otros 17 asmáticos que continuaban con síntomas a los tres años tampoco habían respondido a la prueba de provocación bronquial realizada al diagnóstico:

<b>Provocación con Lolium</b> <i>(Evolución a los 3 años de los asmáticos iniciales)</i>		
	ASMA → ASMA	ASMA → RC
Prueba negativa	17	17
Caída con 100.000 U.B.	5	4
Caída con 10.000 U.B.	5	1
Caída con 1.000 U.B.	1	0

Sí pudimos demostrar que los asmáticos que no habían respondido a la prueba de provocación bronquial antigénica estaban asintomáticos o presentaban asma leve más frecuentemente que los que sí habían respondido a la prueba ( $\chi^2$   $p < 0.05$ ):

<b>Asma durante la tercera primavera</b> <i>(Evolución a los 3 años de los asmáticos iniciales)</i>		
	MODERADO-SEVERO	LEVE
Prueba negativa	4	31
Caída con $\leq 100.000$ UB	7	8

## **V. DISCUSSION**

### **V.1.-Análisis de la muestra**

En el momento de la primera visita nuestro grupo de 101 niños polínicos presentaba una edad media de 9.75 años y, aunque el inicio de la enfermedad se situaba en una media de 7 años, es de destacar el comienzo a edades tan tempranas como los 2 años en algún caso. Estos datos son muy similares a los aportados por Gómez Carrasco y cols. (140) que en su estudio sobre una población de 200 niños polínicos encuentran una edad media de inicio de la enfermedad de 6 años, y presentan 7 niños con comienzo antes de los 2 años. En cualquier caso se trata de edades más tempranas que las habitualmente manejadas por otros autores extranjeros, que sitúan la edad media de inicio de la polinosis alrededor de los 15 años (139). No se encontraron diferencias etarias entre el comienzo del proceso en los rinoconjuntivíticos y los asmáticos.

En general se dice que el asma tiende a desarrollarse, o al menos a diagnosticarse, antes que la rinitis. Aproximadamente el 75% del conjunto de los asmáticos ha comenzado su sintomatología antes de los 10 años, y cerca de la mitad lo ha hecho antes de los 3. En cuanto al asma de etiología alérgica casi 2/3 lo ha desarrollado antes de los 15 años, mientras que solo el 32% del asma que comienza después de los 45 años está mediado por IgE. En un estudio realizado por Croner y Kjellman (221) se siguió, durante 11 años, a una cohorte de 1654 niños nacidos consecutivamente. Entre los 10 y 11 años encontraron una incidencia de asma del 3%, con una prevalencia del 5.3%. La enfermedad había comenzado antes de los 18 meses en el 30% y antes de los 3 años en la mitad de los niños. En otro trabajo sueco, realizado por Van Asperen y cols. (222), se siguió, durante 5 años, a un grupo de 57 niños hijos de padres atópicos. Al final de ese plazo se encontró que el 58% había desarrollado dermatitis atópica, el 49% sibilancias aisladas, el 33% sibilancias recurrentes, el 68% rinitis y el 18% reacciones inmediatas a alimentos. Todas las alergias a alimentos y el 94% de las dermatitis atópicas habían comenzado antes de los dos primeros años de vida, mientras que solo el 57% de los niños con sibilancias aisladas y el 53% de los niños con sibilancias recurrentes había tenido síntomas durante ese tiempo. También se pudo comprobar que, salvo en el caso de los

episodios de sibilancias aisladas, el resto de patología se asoció claramente a enfermedades atópicas en épocas posteriores de la vida. Durante los dos primeros años las sensibilizaciones encontradas fueron casi exclusivamente a alérgenos alimentarios y habitualmente se trató de cuadros transitorios. La sensibilización a inhalantes se presentaba posteriormente, apareciendo en primer lugar la alergia a inhalantes comunes (ácaros del polvo y epitelios de animales domésticos), siendo la más tardía la sensibilización a pólenes. Como explicación se ha dado que el individuo, genéticamente condicionado para la atopia, precisaría haber contactado con el polen durante varias primaveras para terminar desarrollando clínica.

Al estudiar la rinitis alérgica estacional nos encontramos con algo similar. En un estudio efectuado por Schachter y Higgins en Michigan se observó que la rinitis alérgica perenne comenzaba antes que la estacional. Para ésta encontraban una edad media de comienzo a los 15 años, con un pico de prevalencia entre los 16 y los 24 (223).

Del total de niños estudiados hay que destacar que 70 comenzaron presentando síntomas rinoconjuntivales exclusivamente, pero 22 de ellos desarrollaron asma entre 1 y 6 años después. Todos los asmáticos manifestaron rinoconjuntivitis, más o menos intensa, desde el primer momento. También hubo dos niños que tuvieron como primer síntoma una urticaria, pero al cabo de 2 años habían desarrollado rinoconjuntivitis y asma. Después de 3 años de inmunoterapia otros 7 pacientes, inicialmente catalogados de rinoconjuntivitis, presentaron asma.

Habitualmente se dice que la rinoconjuntivitis estacional que comienza en la infancia va aumentando en intensidad durante los 2-3 primeros años. Después se estabiliza y alcanza la vida adulta, para posteriormente declinar con la edad. En un estudio realizado en Finlandia por Linna y cols. (224) se siguió, durante 8-11 años, a un grupo de 154 niños con rinoconjuntivitis alérgica. Al cabo de ese tiempo estaban totalmente asintomáticos solo el 10%. Los síntomas conjuntivales habían desaparecido o eran fácilmente controlables con tratamiento local en casi todos los casos. Un 23% de las rinitis estacionales se habían convertido en perennes, mientras que solo un 16% de las perennes se había hecho estacional. Un 19% de todos los pacientes

había desarrollado asma, hecho que era mas común entre los aquejados de rinitis perenne (34% de ellas se asociaron a asma) que entre la rinitis estacional (solo tenían sibilancias el 12.72%). No se encontró que la edad de comienzo de la rinitis, la historia familiar de alergia o el tratamiento con inmunoterapia influyera de algún modo. En nuestro caso, más del 40% de los pacientes, que inicialmente solo tenían rinoconjuntivitis, desarrolló asma, cifras muy lejanas de las aportadas por otros autores como Broder-Smith que da un 3% (225) o Hagy y Sttipane que refieren un 6% (226). Creemos que nuestros resultados pueden estar sesgados, pues se trata de pacientes hospitalarios aquejados de una sintomatología rinoconjuntival lo suficientemente severa para ser remitidos a una consulta especializada, que por lo tanto no reflejarían lo que ocurre en el conjunto de la población.

En cuanto al sexo, nos encontramos con que en el grupo de rinoconjuntivitis no existían diferencias significativas entre varones y hembras. Sin embargo, había un predominio significativo de varones en el grupo de los asmáticos ( $p < 0.05$ ). Estos resultados se acercan bastante a lo comúnmente admitido, que cifra la misma prevalencia de rinitis en ambos sexos, mientras que el asma se considera mas corriente entre los niños que entre las niñas. Aunque no todos los autores dan números semejantes, las relaciones de 1.5:1 y 3:1 son las más frecuentemente manejadas. Esto parece cumplirse sobre todo en los primeros años de vida, pues a medida que nos acercamos a la adolescencia las diferencias se van limando, pudiendo incluso invertirse los término en la edad adulta. En un estudio de seguimiento efectuado por Andersson y cols. (227), realizado desde el nacimiento hasta los 23 años en niños sanos, encontraron una incidencia anual de asma del 2.6% en el grupo de edad de 0-7 años, del 1.1% de los 12 a los 16 años y del 0.17% de los 17 a los 23 años. En los dos primeros grupos se observó la existencia de casi el doble de niños que niñas, mientras que en el tercero había un chico asmático por cada dos chicas. Para explicar estas diferencias se han emitido teorías no totalmente demostradas y bastante cuestionadas. Se ha dicho que durante los primeros años de vida los varones padecerían más infecciones respiratorias. Estas mantendrían un estado de inflamación persistente en la mucosa bronquial que facilitaría el broncoespasmo. Sin embargo, en la edad adulta, los cambios hormonales propios de la mujer condicionarían una mayor reactividad de la vía aérea.

Revisando los antecedentes familiares vimos que, en el conjunto del grupo estudiado, el 59% tenía antecedentes familiares de alergia y el 49% de asma, no observándose diferencias significativas entre asmáticos y rinoconjuntivíticos.

Se sabe que tanto el asma como la atopia se heredan, aunque el patrón de herencia no está aclarado. Se ha sugerido la existencia de un factor genético común y una forma de herencia poligénica o dominante con penetración incompleta. En los estudios efectuados por Smith (228) en Iowa se vio que el 87% de los niños que desarrollaban alguna manifestación de alergia antes de los 10 años tenía algún familiar alérgico. El 28% de los niños y el 16% de las niñas con estos antecedentes presentaban asma o rinitis alérgica antes de los 20 años, mientras que entre los niños sin antecedentes familiares atópicos estas cifras eran respectivamente del 1.5% y del 0.08%. Aunque para algunos autores estas diferencias se explicarían por factores ambientales más que por patrones de herencia definidos, sí parece claro que la historia familiar tiene una alta sensibilidad para identificar el riesgo alérgico de un sujeto, aunque su especificidad sea baja, pues bastantes individuos con parientes próximos alérgicos no desarrollan la enfermedad. En los estudios de seguimiento realizados en Suecia por Kjellman se demostró que, para un recién nacido, el riesgo de desarrollar alguna enfermedad alérgica era mayor del 75% si ambos padres eran alérgicos y con síntomas del mismo tipo (229).

Mientras que la rinoconjuntivitis tiene un patrón de herencia similar al de el resto de las enfermedades alérgicas, la heterogeneidad del asma hace que no todos los autores estén de acuerdo sobre la importancia de los antecedentes familiares en su aparición. Ya Cooke y VanderVeer, en 1916, demostraron que el 48% de los pacientes que sufrían asma bronquial tenían antecedentes de alergia en su familia, frente a un 7% en un grupo control. Unos años después, en 1924, Sapin y Cooke, estudiando a una serie de pacientes con asma y fiebre del heno, encontraron antecedentes familiares positivos de alergia en el 58.4% y solo en un 6.7% del grupo control. Un estudio sueco, efectuado por Edfors-Lubs en 1971 con 7.000 parejas de gemelos, demostró una concordancia para el asma del 19% en los monozigotos y del 4.8% en los dizigotos. Se deducía por tanto que no solo los factores genéticos, si no probablemente más los ambientales, tenían importancia a la hora de que un sujeto manifestara asma. Sin



embargo, no todos los autores llegan a las mismas conclusiones y así Lebowitz y cols.(230), entrevistando a 344 familias estadounidenses, vieron que cuando ninguno de los padres padecía asma la incidencia de niños asmáticos era del 6.5%, mientras que si uno de los padres lo sufría el 63.6% de los niños también. Por otra parte se sabe que los asmáticos intrínsecos, que no tienen más antecedentes de alergia que la población general, presentan una proporción similar de antecedentes familiares de asma que los asmáticos extrínsecos (231). De ahí se podría deducir la existencia de un factor genético, heredable o no de forma conjunta con el de la atopia, que condicionaría la futura expresión de asma. Este factor sería la hiperreactividad bronquial y, efectivamente, se ha visto que los hermanos gemelos homocigotos de asmáticos, pueden o no manifestar asma pero sí responden positivamente a la provocación con metacolina (232). Esta hiperreactividad de la vía aérea modulada por factores ambientales daría lugar al asma y, si además el sujeto había heredado el rasgo atópico, este asma sería de tipo alérgico.

El modo de herencia de la atopia tampoco parece claro. Existirían factores genéticos, probablemente independientes, que modularían el nivel de IgE, la respuesta inmune a antígenos específicos y la capacidad de formar anticuerpos IgE frente a dichos antígenos. Se ha visto una mejor correlación de los niveles de IgE entre gemelos monozigotos que entre dizigotos (233). También se ha comprobado una mejor correlación de este factor entre los gemelos en edad infantil (78%) que entre los gemelos adultos (59%), como si a medida que pasaran los años fuesen cobrando mayor importancia los factores ambientales. Estudios realizados con pacientes alérgicos y sus familiares llevaron a la conclusión de que existiría un gen de fenotipo de baja producción para la IgE, denominado R, que sería dominante con respecto al fenotipo de producción elevada, llamado r. Gerrard y cols. (234), tratando de comprobar tal hipótesis, descubrieron que el número de descendientes con niveles elevados de IgE (rr) era muy parecido al previsto. Ultimamente, mediante enlace con el marcador D11S97, se ha localizado el gen de la atopia en el cromosoma 11q. Este gen sería el que regularía la producción de IgE (235). Además, se ha visto que el 62% de los hijos atópicos comparten con la madre el alelo 11q, mientras que el 38% no lo hace, cuando la proporción esperada sería 50/50 (236). Esto significa que la transmisión de la atopia sería más frecuente a través de la línea materna, hecho apuntado ya por Bray en 1931 y por Schwartz en 1952 y refrendado por Magnusson (237)

que encuentra niveles mas altos de IgE en sangre de cordón en los hijos de madres alérgicas que en los de padres alérgicos. También en nuestro estudio las manifestaciones de alergia eran más frecuentes entre las madres que entre los padres ( 15 casos frente a 8 ), así como el asma perenne no filiado ( 5 casos frente a 1 ). Por último hay que decir que se ha relacionado el gen 11q con la presencia de hiperreactividad bronquial a la metacolina (238), con lo que quizás en un futuro próximo se pueda encontrar el nexo de unión entre ambos procesos: atopia e hiperreactividad bronquial.

Analizando los antecedentes personales de alergia y de asma nos encontrábamos que el 23.76% del grupo analizado tenia antecedentes personales de alergia y el 30.69% de asma. Un 11.88% seguía presentando dermatitis atópica en el momento de la primera consulta. Los rinoconjuntivíticos habían padecido algún problema atópico en igual proporción que los asmáticos, pero estos últimos tenían más antecedentes de asma que los primeros (  $p < 0.05$  ).

Como es bien conocido los pacientes alérgicos a menudo sufren diversas manifestaciones de atopia a lo largo de su vida, no siempre coincidentes en el tiempo. En un estudio realizado con niños de 15 y 16 años en Finlandia, Varjonen y cols. (239) encontraron que, con una prevalencia de enfermedades alérgicas del 21%, existía un 9.7% de dermatitis atópica, un 14% de rinitis alérgica y un 2.5% de asma. Además, se pudo comprobar que el 38% de los sujetos con rinitis y el 31% de los asmáticos presentaba dermatitis atópica .

La frecuencia de dermatitis atópica en pacientes con asma varía, según los autores, entre un 6 y un 63%, siendo más frecuente cuanto más asmáticos existen en la comunidad y viceversa. Los niños con dermatitis atópica tienen de 5 a 10 veces más probabilidades de desarrollar rinitis alérgica y/o asma que la población general. De esa manera, entre un 20 y un 60% de lactantes con dermatitis atópica terminará presentando asma y entre un 30 y un 40% tendrá síntomas de rinitis alérgica. No hay que olvidar, y así lo refleja el trabajo de Van Asperen (222) que no todas las dermatitis cursan con síntomas respiratorios, sino que hay un grupo de ellas que se asocia exclusivamente a alergia alimentaria.

El claro predominio de antecedentes personales de asma entre los asmáticos polínicos parece lógico. Sin embargo, hay que destacar que bastantes sujetos que tuvieron asma en los primeros años de vida presentaron solo rinoconjuntivitis como manifestación alérgica.

Merece especial comentario, por su frecuencia, la presencia del asma asociado a procesos infecciosos respiratorios. Parece que las infecciones víricas respiratorias tienen un importante papel en la producción de sibilancias en niños pequeños. Es posible que el edema de la mucosa y el exceso de moco producido a consecuencia de la viriasis, al actuar sobre una vía aérea de pequeño calibre, sean suficientes para dar lugar a sibilancias y dificultad respiratoria. Se ha visto que los lactantes con un volumen pulmonar pequeño son más susceptibles a sufrir este tipo de patología que aquellos que tienen un volumen normal (240). A medida que estos niños fueran creciendo aumentaría el calibre de su vía aérea y serían menos susceptibles a padecer este tipo de procesos.

En trabajos realizados a finales de los 60 se decía que todos los niños sibilantes pertenecían a un grupo homogéneo poseedor de un mismo patrón genético. Se barajaba la posibilidad de que las infecciones víricas, al dar lugar a una inflamación de la mucosa bronquial, permitieran el paso de neumóalergenos a su través y de esa manera desencadenaran la atopia en individuos genéticamente predispuestos. Existen ciertos indicios de que las infecciones respiratorias pueden facilitar la sensibilización a alérgenos ambientales. En niños hijos de padres alérgicos, seguidos por esta causa, se pudo comprobar la positivización de las pruebas cutáneas a neumóalergenos a las 2-3 semanas de haber padecido una infección respiratoria de vías altas (241). También se ha visto que los lactantes que desarrollan una respuesta IgE más elevada, tras la infección por virus sincitial respiratorio, presentan asma con más frecuencia. Así mismo, se ha comprobado que los niños que producían mayores niveles de IgE frente al virus de Epstein-Barr, en el curso de una infección ocasionada por éste, presentaban con más frecuencia patología alérgica (242). Quizás el virus induzca la activación policlonal de los linfocitos B y dé lugar a una producción exagerada de IgE en los sujetos genéticamente predispuestos. En un trabajo de seguimiento realizado por Sporik y cols. (243) con 67 lactantes hijos de padres con rinitis alérgica estacional y/o asma, se pudo comprobar

que 21 niños tuvieron sibilancias antes de los dos años. De ellos 16 evolucionaron favorablemente y no volvieron a tener síntomas después de esa edad. Vistos 11 años después 13 ni siquiera respondían a la provocación con histamina. Otros 21 niños comenzaron a presentar sibilancias después de los dos años y de ellos 17 continuaban con clínica a los 11 años. Todos eran atópicos y 4 de los 5 niños, cuya clínica había comenzado antes de los 2 años y que seguía con sibilancias a los 11, también lo eran. Es de destacar que los asmáticos mas graves, que habían precisado diversas hospitalizaciones por broncoespasmo, eran precisamente estos últimos. Por tanto, sí parecen existir no una sino dos poblaciones de niños sibilantes. La primera, con patología limitada en el tiempo, correspondería a los pacientes con pequeño calibre de la vía aérea que al crecer mejoran, mientras que en la segunda población la presencia de atopia perpetuaría los síntomas.

Otra cuestión, que está siendo muy debatida en el momento actual, es la asociación de enfermedades respiratorias, especialmente asma, y el humo del tabaco. En nuestro grupo el 64% de los niños eran, teóricamente, fumadores pasivos. No se encontraron diferencias significativas entre asmáticos y rinoconjuntivíticos, ni se demostró relación con la existencia de asma previo ni con la gravedad del mismo.

Se ha visto, en ratas expuestas a aerosoles de neumoaergenos, que la respuesta IgE era mas elevada entre las fumadoras (244). Pero a pesar de las numerosas investigaciones epidemiológicas realizadas en torno al tema, no está del todo clara la relación entre el asma infantil y la condición de fumador pasivo, existiendo estudios al respecto con resultados contradictorios. Por ejemplo, Ehrlich y cols (245) encontraron más madres fumadoras entre los niños asmáticos que entre los controles sanos, pero no pudieron implicar al humo de tabaco en la aparición de crisis de asma. Sherrill y cols. (246), siguiendo a un grupo de 1037 niños desde los 9 a los 15 años, observaron que los valores absolutos del volumen espiratorio forzado en el primer segundo ( $FEV_1$ ) y de la capacidad vital (VC) eran similares entre los hijos de los fumadores y de los no fumadores. Sin embargo, entre los chicos del primer grupo se detectó una reducción leve y no progresiva del cociente  $FEV_1/VC$ , que no se encontraba entre las chicas ni entre los hijos de los no fumadores. Algunos autores remontan la aparición de daño

pulmonar ocasionado por el tabaco a la época fetal. Así Hanrahan y cols.(247), estudiando la función pulmonar de 80 recién nacidos sanos, hijos de madres que habían fumado durante el embarazo, hallaron que los valores del flujo espiratorio forzado y la capacidad residual funcional eran mas bajos entre los hijos de las fumadoras que entre los de las no fumadoras. Sin embargo, no encontraron diferencias posteriores en la función pulmonar al examinar a los niños después de haber permanecido unas semanas en casa expuestos o no al humo del tabaco materno. Dedujeron que el daño ocasionado por el tabaco durante el embarazo alteraría el desarrollo y/o de las propiedades elásticas del pulmón y esto sería lo que condicionaría la presencia de patología respiratoria de repetición durante los primeros años de vida.

## **V.2.-Análisis de los resultados de las pruebas complementarias**

### **V.2.1- Eosinofilia**

El asma se caracteriza, entre otras circunstancias, por la presencia de eosinófilos en sangre, esputo, líquido de lavado broncoalveolar y biopsia de la mucosa bronquial. Incluso en el asma leve se han encontrado cifras de eosinófilos elevadas, tanto en sangre como en el líquido del lavado broncoalveolar, y se ha podido correlacionar su presencia con la reactividad de la vía aérea a la metacolina (54). Resulta paradójico que los asmáticos graves tengan más eosinopenia que los sujetos normales, pero se ha podido comprobar que, tras la provocación bronquial con antígeno, se produce una disminución de los eosinófilos circulantes en las primeras 3-9 horas que se correlaciona con la magnitud de la respuesta bronquial tardía y el aumento de reactividad de la vía aérea a la provocación con histamina (248), mientras que a las 24 horas se observa un aumento de los eosinófilos que no se correlaciona con dicha respuesta ni con el aumento de la reactividad a la histamina (249). Así mismo, se ha visto que existe una correlación inversa entre los niveles sanguíneos de la proteína catiónica del eosinófilo (ECP) y el pico flujo (65). De ello se deduce que son los eosinófilos activados y no los totales los que actúan en el asma. Abundando en este tema, se ha podido comprobar que la mejoría clínica del asmático tratado con corticoides, se asocia a una disminución de los eosinófilos hipodensos (activados) en sangre periférica, tan solo 14 días después de iniciado este (66).

Al haber medido únicamente eosinófilos totales en sangre periférica no es extraño que no hayamos encontrado diferencias entre asmáticos y rinoconjuntivíticos. Por otra parte, el 17.2% de nuestros pacientes presentaban elevación de los eosinófilos en sangre periférica, lo que creemos refleja únicamente la presencia del rasgo atópico que todos ellos compartían.

### **V.2.2.- Alteraciones radiológicas de los senos paranasales**

En el momento de la primera consulta el 10.11% de nuestros pacientes mostraban alguna anomalía en la radiografía de senos, pero ninguno refería síntomas específicos que orientaran hacia sinusitis, ni se observaron diferencias significativas entre asmáticos y rinoconjuntivíticos.

Aunque desde antiguo existía la impresión de que el asma podía empeorar por estímulos originados en la nariz y senos paranasales, fue a principios de este siglo cuando tomó cuerpo la idea de que muchos de los asmáticos tenían sinusitis y el tratamiento de ésta mejoraba el asma. Se desconocían los mecanismos por los que la infección de los senos paranasales podía precipitar una crisis de asma, pero ya en 1925 Gottlieb propuso los siguientes:

**a.-** Se produciría un goteo de material infectado hacia la faringe que daría pie a la infección de ésta y de la traquea.

**b.-** Los gérmenes causantes de la sinusitis originarían una serie de productos que serían absorbidos y se produciría una reacción alérgica frente a los mismos.

**c.-** La respiración bucal, muchas veces asociada a la sinupatía, ocasionaría que el aire frío y seco llegara a las vías aéreas inferiores y ocasionara broncoespasmo.

**d.-** Se pondría en marcha un reflejo nasobronquial, con vía aferente trigeminal y eferente vagal que daría lugar a la broncoconstricción.

A esta lista especulativa se le agregó después la posibilidad de que existiera un aumento del bloqueo  $\beta$ -adrenérgico inducido por la infección. Salvo la presencia del reflejo nasobronquial, ninguno de los mecanismos propuestos ha sido claramente demostrado. Estudios realizados por Kratchmer en 1966, con gatos y conejos, y por Kaufman y Wrigth en

1969 en humanos, pusieron de manifiesto que la estimulación de los receptores presentes en la nariz y en la nasofaringe podía dar lugar a bronconstricción refleja.

Pese a todo, y desde el punto de vista clínico, se ha seguido especulando sobre la asociación de asma y sinusitis. En primer lugar se había visto una gran incidencia de datos radiológicos anormales en individuos con asma. Por ejemplo, Rachelefsky y cols. (250) trataron de sinusitis a 48 niños asmáticos y notaron mejoría clínica y funcional del asma en el 79%. Sin embargo, estudios mas recientes vuelven a sembrar la duda al respecto. Así, se ha comprobado que el 40-50% de los adultos y de los niños con asma tienen anomalías radiológicas a nivel de los senos paranasales, sin que se pueda establecer una relación entre su presencia y la gravedad del asma (251). Tampoco se ha encontrado una respuesta diferente a la metacolina entre los sujetos con sinupatía y sin ella (252). En la actualidad se piensa que la sinusitis y el asma son manifestaciones inflamatorias originadas por el mismo proceso y situadas a diferentes niveles del aparato respiratorio.

#### **V.2.3.- Niveles de IgE total e IgE específica frente a *Lolium***

La producción de IgE dirigida contra ciertos antígenos, por otra parte inocuos, es el rasgo principal de la atopia. Las células plasmáticas, productoras de esta inmunoglobulina, se localizan principalmente en el tejido linfoide adyacente al aparato respiratorio y al digestivo, alcanzando una concentración máxima en las amígdalas y las adenoides. La IgE producida puede aparecer en las secreciones o bien penetrar en la circulación sistémica y unirse a la membrana de los mastocitos y de los basófilos de todo el organismo. Las células portadoras de IgE se observan ya en la 11 semana de gestación, tanto en el tejido pulmonar como en el hepático, aunque la producción es tan escasa que para detectar IgE en sangre de cordón, en el recién nacido a término, hay que emplear métodos más sensibles que en edades posteriores de la vida. Después del nacimiento los niveles de IgE van aumentando progresivamente, alcanzándose los del adulto hacia los 6 años. A partir de la segunda década de la vida van disminuyendo progresivamente. Algunos autores han demostrado, en niños de 10 a 14 años,



niveles superiores a los del adulto, pero se ignora que trascendencia clínica pueda tener este hecho. No se han observado diferencias respecto al sexo.

Durante la primavera, se ha visto que los polínicos presentan elevaciones dobles o cuádruples de los niveles de IgE detectados fuera de dicha estación. Las cifras máximas se alcanzan a las 4-6 semanas después del pico de polinización. Luego continúan bajando paulatinamente y alcanzan el nivel mínimo justo antes del comienzo de la segunda polinización (253).

No todos los pacientes alérgicos muestran una IgE elevada en suero. En un estudio efectuado por Wittig y cols. (254) con 570 asmáticos y 244 riniticos, se observó que con una cifra de IgE de 320 UI/ml +2SD, la especificidad de esta determinación era del 98%, tanto para el asma como para la rinitis. Sin embargo, la sensibilidad bajaba al 55% para el primero y al 30% para la segunda. Si se utilizaba el nivel de 100 UI/ml la sensibilidad aumentaba hasta el 78% para el asma y el 60% para la rinitis, pero la especificidad disminuía en ambos y se quedaba en el 80%.

Dado el escaso rendimiento que cabía esperar de la prueba, resultó llamativo que el 45.55% de nuestros pacientes presentara una IgE elevada en el momento de la primera visita, y ésta se diera más entre los asmáticos (  $p < 0.02$  ). Por otra parte, los que tenían la IgE elevada en el otoño-invierno presentaron más frecuentemente asma en la siguiente primavera (  $p < 0.05$  ).

En un trabajo de seguimiento de 912 adultos, realizado por Annesi y cols. (255), se pudo observar, en sujetos no fumadores ni atópicos, que existía una relación inversa entre el nivel de IgE circulante y el FEV<sub>1</sub>. Después de 5 años de seguimiento, se detectó una disminución más acelerada de los valores del FEV<sub>1</sub> si la IgE permanecía aumentada y concluían que esa IgE elevada podría traducir un estado de inflamación bronquial, independiente de la atopia, que predispondría al sujeto a presentar problemas respiratorios con más frecuencia.

En cuanto a la determinación de la IgE específica frente al *Lolium* es difícil definir su rendimiento diagnóstico, al carecer de un método de referencia completamente fiable que diagnostique con seguridad la sensibilidad de un sujeto frente a un determinado alérgeno. Si comparamos los resultados del RAST con los de la historia clínica se comprueba que la sensibilidad diagnóstica varía mucho y depende del tiempo transcurrido entre la exposición al alérgeno y la realización de la prueba, el tipo de alérgeno ensayado, la edad del paciente y el órgano afectado. En general, hay una aceptable relación con los niveles de IgE totales (256). Pero no todos los individuos que presentan anticuerpos IgE específicos frente a determinados antígenos poseen niveles elevados de IgE total y viceversa. Como vimos anteriormente, el gen que regula la producción de IgE se ha localizado en el cromosoma 11q. Aunque no se conoce exactamente la función de los productos proteicos del locus en cuestión, se ha especulado con que estaría más relacionada con la producción inespecífica de IgE que con la capacidad de respuesta frente a un antígeno dado. Se ha planteado que quizás esta respuesta vendría determinada por factores tales como la cantidad de alérgeno con el que se había contactado o por la modulación efectuada por los genes HLA que se encuentran en el cromosoma 6. Ya Marsh (257) demostró que el 95% de los individuos sensibilizados al antígeno Amb a V de la *Ambrosia artemisiifolia* expresaban Dw2. Como las proteínas codificadas por la región HLA intervienen en muchos aspectos del reconocimiento inmunológico, incluida la interacción entre linfocitos y células presentadoras de antígeno, así como entre diferentes linfocitos, la variación genética a este nivel podría determinar que el patrón de respuesta alérgica específica fuese diferente de un individuo a otro. Incluso se ha relacionado la presencia de ciertos haplotipos de la clase DR2 con la presencia de asma en sujetos sensibilizados a la *Artemisia* (258), lo que explicaría las distintas manifestaciones clínicas que se dan entre los miembros alérgicos de la misma familia.

#### **V.2.4.- Resultado de las pruebas cutáneas**

Ya en 1865 Blackley, que padecía fiebre del heno, practicó una escarificación en su antebrazo y depositó una gota de agua que contenía polen de *Lolium*, observando la aparición de una pápula con eritema. Pero hubo que esperar a principios de este siglo para que autores

como Smith, Walker y Lewis convirtieran a las pruebas cutáneas en la principal herramienta diagnóstica de la alergia. Actualmente, y después de los numerosos trabajos realizados al respecto, están bien establecidos los índices de validez para cada una de las técnicas empleadas (259).

En nuestro trabajo comprobamos que el 45.5% de nuestros niños estaban sensibilizados a alergenitos distintos al polen de gramíneas, siendo el polen de olivo el más frecuente. El 36.63% del total de nuestros polínicos presentaban dicha sensibilización. Estos datos se acercan bastante a los proporcionados por otros autores para una población similar a la nuestra (145). Los polisensibilizados eran más frecuentemente asmáticos (  $p < 0.05$  ), tenían más antecedentes personales de asma (  $p 0.04$  ), cifras de IgE más elevadas (  $p < 0.01$  ) y respuesta positiva con diluciones más bajas de *Lolium* en la prueba del prick-test (  $p < 0.05$  ).

La explicación podría ser la ya apuntada por otros autores (260). Los individuos muy alérgicos tendrían mayor número de reacciones cutáneas positivas, formación de pápulas mayores y niveles de IgE circulante superiores. Esta “carga” alérgica elevada se manifestaría con una reactividad elevada tanto de la piel como del bronquio, provocando en este último mas asma.

En cuanto a la técnica del prick-test creemos que se trata de una prueba controvertida (261) que a nosotros nos resultó de escasa utilidad, pues no encontramos correlación con otras pruebas ni nos orientó respecto al curso clínico de la polinosis.

#### **V.2.5.- Resultado de la prueba de provocación conjuntival**

Fue también Blackley quien, en 1873, realizó las primeras pruebas de provocación conjuntival, observando la aparición de enrojecimiento, prurito y lagrimeo tras el contacto de la conjuntiva ocular con una solución de polen de *Lolium*. Posteriormente la técnica cayó en desuso y ha vuelto a cobrar cierta vigencia en los últimos años, especialmente en el campo

pediátrico, por no precisar la colaboración del paciente y carecer de efectos secundarios importantes.

En nuestro trabajo, la prueba de provocación conjuntival resultó positiva en todos los casos salvo en dos asmáticos, observándose una clara correlación con la historia clínica y la positividad de las pruebas cutáneas. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores (262). Sin embargo, no ayudó a distinguir entre rinoconjuntivíticos y asmáticos. Tampoco se vio correlación con las cifras de IgE total ni con las de IgE específica tal como han constatado algunos autores (263), aunque no otros (264).

Sí que resultó útil para predecir la gravedad de los síntomas conjuntivales en la siguiente primavera: la mayoría de los sujetos que no presentaron conjuntivitis o tuvieron síntomas mínimos, durante la segunda primavera, no habían respondido a la prueba de provocación conjuntival o lo habían hecho con la dosis máxima ( $p < 0.01$ ).

Como antes hemos comentado, entre los polínicos se produce un aumento de IgE total e IgE específica durante la primavera, que luego va disminuyendo a lo largo del año. Esta variabilidad sucede también con otras pruebas, como la provocación nasal, pero no con la provocación conjuntival (265). La inflamación que sufre la conjuntiva ocular durante la primavera es suficientemente intensa como para que se reactive la sintomatología a la menor provocación, incluso fuera de la estación polínica. Cabría la posibilidad de que los sujetos que no han reaccionado, o lo han hecho con las dosis más grandes de alérgeno, fuesen los menos reactivos, por lo que durante la primavera serían los que menos clínica presentarían.

### **V.3.- Análisis de los resultados de las pruebas de provocación bronquial**

#### **V.3.1.- Prueba de provocación con metacolina**

Encontramos que los individuos con antecedentes personales de alergia respondían mas fácilmente a la provocación con metacolina que aquellos con antecedentes negativos (  $p < 0.05$  ). Fue la dermatitis atópica, y no la alergia alimentaria, la que se relacionó con ésta hiperrespuesta. Estos resultados están en consonancia con los de otros autores que han investigado el tema. Así Zwerchkenbaum y cols. (266) obtienen los mismos resultados con el test de metacolina realizado después de administrar al sujeto el alimento al que está sensibilizado o un placebo.

En cuanto a los 12 pacientes que presentaban dermatitis atópica, en la primera consulta, 9 respondieron a la metacolina (  $p < 0.001$  ). Estos resultados son similares a los aportados por otros autores. Corbo y cols. (267) encontraron que la mitad de sus 40 pacientes con dermatitis atópica, 8 de ellos con asma clínico, respondían a la metacolina, mientras que Barker y cols. (268) vieron que de 12 sujetos con dermatitis atópica exclusivamente 7 respondían a la metacolina. Se sabe que muchos pacientes con dermatitis atópica desarrollan rinitis y/o asma, pero aproximadamente un tercio solo tendrán manifestaciones de atopia a nivel cutáneo. Si la alergia y la hiperreactividad bronquial fuesen cuadros distintos cabría esperar que aquellos sujetos sin asma no tendrían hiperreactividad bronquial. Pero nos encontramos con que una parte no despreciable de pacientes afectos de dermatitis atópica sin asma clínico responden a la metacolina, aunque no a otras pruebas de provocación bronquial. Por otra parte, es de sobra conocida la aparición de una respuesta retardada de blanqueo de la piel cuando se inyecta *intradérmicamente* acetilcolina. No se ha aclarado cual es el mecanismo de este fenómeno, habiéndose implicado tanto a la aparición de una vasoconstricción como de una vasodilatación con edema. Quizás la hiperrespuesta a la metacolina no fuese mas que el equivalente bronquial de la respuesta cutánea ante agentes colinérgicos (269). También se ha planteado que los

sujetos con dermatitis atópica y metacolina positiva constituirían un grupo de riesgo de padecer asma, pero esa hipótesis aún no ha sido confirmada.

Aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, los sujetos que respondieron a dosis más pequeñas de metacolina tenían más frecuentemente antecedentes personales de asma. Se ha comentado mucho hasta que punto las sibilancias en los primeros años de vida podrían constituir un terreno abonado para el ulterior desarrollo de asma. Como se dijo anteriormente, se ha podido constatar que los niños con sibilancias de repetición en los primeros años de vida presentan parámetros de función respiratoria con valores inferiores a los controles sanos (240). Esta circunstancia no implica necesariamente la coexistencia con hiperreactividad bronquial (270). Sin embargo, en estudios anteriores realizados en niños de nuestra Sección, que habían presentado catarrros de repetición con broncoespasmo se pudo constatar, años depuse de estar asintomáticos, que la mitad de ellos presentaban una respuesta positiva a la provocación con metacolina (271).

También se pudo observar que los niños con antecedentes familiares de asma en primer grado respondían a dosis significativamente mas pequeñas de metacolina que los que no tenían dichos antecedentes (  $p < 0.05$  ). Esto estaría en consonancia con lo encontrado por otros autores que han observado hiperrespuesta a la metacolina entre los hermanos (272) y los padres asintomáticos (273) de los niños con asma.

No se pudo relacionar la presencia de padres fumadores y la mayor respuesta a la metacolina en los niños, bien por lo anteriormente comentado sobre el estado de fumador pasivo de nuestros pacientes, bien porque la influencia del tabaco sobre la hiperreactividad bronquial no está clara, habiéndose encontrado en los hijos de fumadores tanto hiperrespuesta a la metacolina (274) como respuesta negativa (275).

Quizás uno de los resultados más llamativos de nuestro trabajo fue que la metacolina no resultó útil para distinguir a los pacientes asmáticos de los rinoconjuntivíticos. Se sabe que entre los asmáticos existe una hiperrespuesta a ciertos agentes broncoconstrictores como la

histamina o la metacolina, y aunque se ha llegado a invocar la positividad de la prueba de provocación bronquial con cualquiera de estas sustancias como sinónimo de asma, la presencia de una hiperrespuesta similar en enfermedades como la fibrosis quística o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica han hecho dudar de esta relación tan estrecha.

En cuanto a la rinitis alérgica ya Curry, en 1947, demostró que los pacientes con fiebre del heno y sin asma respondían a la inyección de metacolina o de histamina con una broncoconstricción más severa que los sujetos normales. Posteriormente se han publicado diversos trabajos en los que se observan distintos grados de respuesta positiva a la metacolina entre la población de riniticos, asmáticos e incluso sujetos normales. Así, Townely y cols. (276), estudiando a un grupo de 27 pacientes con rinitis alérgica, encontraron que la mitad de ellos respondía a la metacolina. Crockcroft y cols. (277), en un trabajo con 300 escolares, observaron que un tercio de los asmáticos activos, de los antiguos asmáticos y de los pacientes con rinitis alérgica, presentaban respuesta positiva a la provocación con histamina con dosis moderadas. A concentraciones muy bajas del agente provocador prácticamente solo respondían los asmáticos activos, mientras que a dosis muy elevadas lo hacían el 60% de los normales, el 5% de los asmáticos activos y el 10% de los pacientes con rinitis alérgica.

Ramsdale y cols. (278) realizaron povocaciones con metacolina e hiperventilación con aire frío a un grupo de 25 sujetos afectos de rinitis alérgica sin asma. Posteriormente los monitorizaron desde el punto de vista clínico y de la función pulmonar (registro del peak-flow diario). Encontraron que 10 pacientes respondieron positivamente a la metacolina, 5 de los cuales también lo hicieron a la provocación con aire frío. Dos de estos mostraban variabilidad significativa en el registro diario del peak-flow, aunque no asma clínico. De todo ello dedujeron que la presencia de hiperreactividad bronquial en los riniticos no era un resultado positivo falso, sino que revelaba la presencia de asma oculto.

Gerblich y cols. (279) estudiaron a 17 sujetos con rinoconjuntivitis polínica y realizaron test de metacolina en primavera y en invierno. Encontraron que 15 de ellos respondían con la misma intensidad en ambas estaciones. Al observar los valores de la función pulmonar

constataron que, mientras el FEV<sub>1</sub> y la CVF eran similares en la época de polinización y fuera de ella, la resistencia en la vía aérea aumentaba durante la primavera. Por lo tanto, dedujeron que los riniticos polínicos tenían un comportamiento diferente al de los sujetos normales, pues respondían a la metacolina. También eran distintos a los asmáticos, pues presentaban cierto grado de broncoconstricción primaveral sin clínica, y sin aumento posterior de la respuesta a la metacolina.

Braman y cols. (280) realizaron test de metacolina a 52 pacientes con rinitis polínica y encontraron que el 38% tenía respuesta positiva. A continuación siguieron a 40 durante 4-5 años. De estos 16 había respondido a la metacolina. Tres (7.5%) se convirtieron en asmáticos durante los 2-3 primeros años del seguimiento. Se trataba de sujetos que habían respondido con dosis muy bajas de metacolina. Pero esto también había sucedido con otros individuos que no llegaron a desarrollar asma. Cuando finalizó el seguimiento se repitió la prueba de provocación en 14 de los 16 inicialmente respondedores y se encontró que 9 continuaban siéndolo. De los 24 pacientes que originalmente no mostraban respuesta, se repitió la prueba a 17 y encontraron que 2 sí lo hacían, pero ninguno desarrolló asma. Por lo tanto, parecía que el hecho de responder a la metacolina entrañaba cierto riesgo posterior de sufrir asma, pero el grado de respuesta no tenía ningún valor predictivo, siendo quizás decisiva la exposición individual de cada paciente al polen ambiental durante la primavera.

En nuestro estudio el 47,91% de los niños con rinoconjuntivitis había respondido a la primera metacolina y el 45% a la segunda, no habiéndose modificado el grado de respuesta en el 30% de los casos. Después de 3 años de inmunoterapia se vio que de los 44 rinoconjuntivíticos iniciales 7 había desarrollado asma. De estos, 3 habían respondido positivamente a la metacolina. De los 50 asmáticos iniciales, que continuaron en el estudio, 22 habían quedado asintomáticos al cabo de los tres años. De estos, 16 habían respondido negativamente a la primera metacolina. El grado de respuesta inicial no sirvió para pronosticar cual iba a evolucionar favorablemente y cual tenía riesgo de desarrollar asma.



Los niños rinoconjuntivíticos que tuvieron posteriormente asma no mostraron connotaciones clínicas iniciales que hicieran sospechar esta evolución, pues aunque algunos presentaban tos durante la primavera, este síntoma también se halló entre los polínicos que no tuvieron sibilancias. Boulet y cols. (281) siguieron con peak-flow diario a 8 pacientes con rinoconjuntivitis polínica durante la primavera y vieron que, aunque todos tenían síntomas rinoconjuntivales mas o menos acusados, solo 6 presentaron tos y ninguno alteraciones en el peak-flow. También realizaron una prueba de provocación con metacolina durante la primavera y otra fuera de dicha estación y encontraron una respuesta mas acusada en la primera que en la segunda. Curiosamente los individuos más tosedores habían sido los que más respuesta a la metacolina presentaban en primavera. En el invierno volvieron a repetir la prueba de provocación con metacolina, después de haber inhalado el sujeto polen en el laboratorio y se encontraron con unos resultados similares a los obtenidos durante la primavera.

Especulando sobre cual sería el mecanismo por el que los riníticos se comportan así durante la prueba de provocación bronquial con metacolina u otras sustancias broncoconstrictoras, se ha comentado que los sujetos riníticos presentarían una respuesta especial caracterizada por la existencia de un efecto meseta: llegado a un punto de caída de la función respiratoria, tras inhalar una determinada dosis de metacolina, por mucho que se aumentara ésta no se obtendrían nuevos descensos (275). Lo mismo se ha podido comprobar en sujetos normales (282), pero no en asmáticos activos (283). Se ha dicho que los riníticos dispondrían de un mecanismo, inicialmente identificado con el sistema inhibitorio no adrenérgico, capaz de impedir la broncoconstricción a partir de un determinado nivel, mientras que los asmáticos carecerían de él (284). Posteriormente se ha identificado la existencia de un "factor relajante", derivado del epitelio bronquial, capaz de proteger al sujeto e impedir el broncoespasmo (285). Para que dicho elemento sea sintetizado se precisa que el epitelio bronquial esté íntegro. Por tanto, cuanto mayor fuese el grado de inflamación bronquial y más desestructurado estuviera dicho epitelio menos síntesis se produciría. Algunos trabajos apoyan esta hipótesis. Así Verdiani y cols. (286) encuentran que los sujetos afectados de rinitis perenne presentan mayor grado de respuesta a la metacolina que los riníticos sensibilizados al polen, incluso comparando el resultado de la prueba cuando ésta se efectúa durante la primavera, y

deducen que cuanto más contacto tenga el sujeto con el alérgeno al que está sensibilizado (caso de la rinitis perenne) más inflamación del epitelio bronquial se producirá y más riesgo de hiperrespuesta a los agentes provocadores. También Prieto (287) encuentra el efecto meseta cuando explora a sus pacientes con rinitis polínica fuera de la primavera, pero no cuando lo hace durante ella. En ese momento se produce una respuesta cada vez más intensa al elevar las dosis de metacolina y deduce que la mayor inflamación bronquial, provocada por el intenso contacto con el polen, sería la responsable. Corren y cols. (288) realizan una provocación nasal con polen de gramíneas y un dispositivo de seguridad para impedir que dicho polen llegue a los bronquios y observan que no se producen cambios en los volúmenes pulmonares o en la conductancia específica, ni tampoco oscilaciones en los valores de peak-flow durante las siguientes 24 horas, pero sí aumenta la respuesta a la metacolina. Según los autores, esto obedecería a cambios inflamatorios producidos en el epitelio bronquial, ocasionados por sustancias broncoconstrictoras liberadas en la mucosa nasal tras la reacción de hipersensibilidad tipo I inducida por el antígeno inhalado y absorbidas por vía sistémica. Apoyando esta hipótesis existen algunos trabajos realizados en conejos a los que se ocasiona una reacción inflamatoria en las fosas nasales y después se les provoca con histamina, observándose una mayor respuesta que en condiciones basales (289). En humanos se ha visto que el tratamiento con pulverizaciones nasales de beclometasona, pero no con inhalaciones bronquiales del mismo corticoide, impide el aumento de la hiperreactividad bronquial que se produce tras la exposición al polen (290), aunque no todos los autores obtienen los mismos resultados (291). Por último, Corren y cols. (292) observaron, en sujetos con rinoconjuntivitis y asma por pólenes, que el tratamiento con beclometasona intranasal durante toda la primavera, además de mejorar la obstrucción nasal, impedía el aumento de hiperreactividad a la metacolina que sí presentaban los que recibieron tratamiento con placebo. Sin embargo, no constataron ninguna diferencia en cuanto a la clínica de asma o los valores del peak-flow. En este caso los corticoides abortarían la respuesta de hipersensibilidad tipo I desencadenada por el polen en la mucosa nasal, y con ello la liberación de mediadores y la ulterior hiperreactividad de la vía aérea.

La correlación entre la respuesta a la provocación con metacolina y el grado de afectación de la vía aérea no está unánimemente admitida. Así, Amaro-Galvez y cols. (293) no encuentran relación entre la severidad del asma y la respuesta a la metacolina, especialmente si la sintomatología asmática es leve. Josephs y cols. (294), en un estudio longitudinal de 8 niños y 12 adultos asmáticos a los que realizan monitorizaciones diarias de peak-flow y provocaciones con metacolina cada 2 semanas durante 12-18 meses, comprueban que los sujetos con mayor respuesta a la metacolina presentan también registros de peak-flow más inestables, aunque no hubiera coincidencia temporal entre la mayor respuesta a la metacolina y los peores registros de peak-flow.

Nosotros, en nuestro estudio, pudimos comprobar la buena correlación existente entre el grado de respuesta severa con la primera metacolina y la presencia de asma moderado o severo en la siguiente primavera (  $p < 0.05$  ). Con la segunda prueba observamos buena correlación entre el grado de respuesta severa y la presencia de asma después de tres años de inmunoterapia (  $p < 0.05$  ). Creemos que estos resultados reflejarían un estado de hiperreactividad bronquial que unido a otros factores intrínsecos (grado de atopia) o extrínsecos (exposición individual al polen) condicionarían la presencia inveterada de asma.

### **V.3.2.- Prueba de provocación con el ejercicio físico**

Ya en el siglo II d. JC, Areteo de Capadocia describió el asma inducido por el ejercicio. Después de ésta descripción el asunto cae en el olvido y durante siglos solo hay referencias anecdóticas, como la los médicos ingleses Willis (1679) y Floyer (1717). A primeros de este siglo se redescubre el asma de esfuerzo y aparecen las primeras descripciones con carácter científico. Así Herbest (1928), Kaltreider (1937) y Eckildsen (1945) publican trabajos al respecto, aunque se considera a Pearson (1952) como el verdadero impulsor del tema. En 1963 Jones describe los efectos que el ejercicio físico tiene sobre la vía aérea y en 1966 Heimlich, Strick y Busser inventan la prueba del tapiz rodante. Desde entonces se ha considerado a la prueba de provocación con esfuerzo como una de las mas indicadas para valorar la presencia de hiperreactividad bronquial en la infancia. Sin embargo, los resultados

obtenidos no han sido unánimemente aceptados. Por ejemplo, la incidencia de asma de esfuerzo, en las poblaciones de riesgo estudiadas, varía entre un 100% (295) y un 14% (296). Estas diferencias se justificarían por los distintos métodos empleados para provocar el esfuerzo físico y los parámetros y valores de caída de la función pulmonar que cada autor considera significativos. Por ejemplo, para algunos sería positiva una caída del FEV<sub>1</sub> del 10% (297), mientras que otros creen mas fiable una del 15% (298) o incluso del 20% (299). Parece que el parámetro que mejores índices de validez presenta es el segundo y este es el patrón guía que recomienda la Sociedad Europea de Respiratorio (221). Aún así, la sensibilidad de la prueba no es buena y en recientes trabajos epidemiológicos se ha podido comprobar que solo es capaz de detectar entre el 7 y el 16% de los sujetos hiperreactivos (300).

En nuestro estudio, con la primera prueba de provocación con ejercicio físico, realizada al diagnóstico, no fuimos capaces de distinguir entre asmáticos y rinoconjuntivíticos. Si considerábamos una alteración severa de la función respiratoria (caída del FEV<sub>1</sub> igual o mayor al 20% del basal) encontrábamos que este hecho acontecía en el 30% de los niños que presentaban antecedentes de asma de esfuerzo frente a solo el 4.5% de los niños que no referían dichos antecedentes (  $p < 0.05$  ). Con la segunda prueba, practicada a 50 pacientes después de tres años de seguimiento, cuando escogíamos una caída del FEV<sub>1</sub> igual o superior al 15% la especificidad respecto a la polinosis era buena: todos los pacientes que habían permanecido asintomáticos o solo presentaron síntomas rinoconjuntivales en primavera respondieron negativamente a la prueba de esfuerzo. Aquellos que respondieron positivamente presentaban más asma fuera de la primavera (  $p < 0.05$  ) y asma moderado-severo durante la estación polínica (  $p < 0.01$  ).

Nos ha sorprendido la buena correlación obtenida entre la historia clínica de asma de esfuerzo y la positividad de la prueba. Otros autores han constatado una escasa sensibilidad para detectar a los individuos asmáticos que referían síntomas de asma de esfuerzo, bien porque las condiciones del laboratorio eran bastante diferentes de las naturales (301), o simplemente porque las molestias referidas no fuesen por broncoespasmo sino por falta de entrenamiento. Kawabori y cols. (302) sometieron a pruebas de esfuerzo a 134 niños asmáticos

alérgicos, 102 alérgicos no asmáticos y 57 niños sanos. Encontraron que el 63% de los asmáticos presentaba una caída del FEV<sub>1</sub> superior al 15%, mientras que esto acontecía también en el 41% de los alérgicos no asmáticos y en el 8% de los sanos. Reinterrogando a los niños, después de estos resultados, vieron que entre los asmáticos el 78% de los que tenía historia de asma de esfuerzo había respondido positivamente a la prueba y el 54% de los que no referían ningún síntoma también. En el grupo de alérgicos no asmáticos, el 45% de los que habían respondido positivamente a la prueba reconocía presentar, tos, fatiga o sensación de opresión torácica con el ejercicio físico, aunque nunca habían sido diagnosticados de asma, pero el resto no presentaba ninguna molestia. Esto quizás se debiera a que estos niños y otros, en condiciones semejantes, limitan voluntariamente la práctica de ejercicio físico y por lo tanto no presentan clínica. Autores mas recientes, como Custovic y cols. (303) sí son capaces de discriminar entre asmáticos y alérgicos no sibilantes. En su trabajo estudian a 70 niños con asma extrínseco leve-moderado, 17 con rinitis alérgica, 9 con otros problemas atópicos (dermatitis atópica y alergia alimentaria) y 48 niños sanos. Después de someterlos a pruebas de esfuerzo encuentran que el 90% de los asmáticos y el 12% de los riniticos responden positivamente, no haciéndolo ninguno de los sanos ni de los afectados de otras alergopatías. Solo el 52.86% de sus asmáticos y ninguno de los riniticos refería asma de esfuerzo.

En nuestro caso, la correlación encontrada entre la historia clínica de asma de esfuerzo y la positividad de la prueba nos ha ayudado a preparar mejor a nuestros niños de cara a la primavera. Este dato, junto con la variabilidad del peak-flow, se consideran de gran utilidad a la hora de predecir el riesgo de un sujeto para sufrir una crisis de asma (304). Los asmáticos polínicos son especialmente susceptibles a sufrir asma de esfuerzo en primavera. Se ha visto que si se realizan pruebas de esfuerzo al aire libre en invierno y en primavera, tanto en asmáticos sensibilizados al polen como en no sensibilizados, los primeros presentan una caída de la función respiratoria mas severa en primavera que en invierno, mientras que los segundos toleran mejor el ejercicio en primavera que en la época invernal. El aire frío de esta estación del año provocaría broncoespasmo en ambos grupos, pero el efecto nocivo del polen durante la primavera sería aún peor para los sujetos sensibilizados a él (305).

Dada la escasa rentabilidad que en general se obtiene de la historia clínica y la importancia que el deporte y la actividad física tienen en la infancia es posible que deban practicarse más pruebas de esfuerzo de rutina para evitar que el asma inducido por ejercicio físico quede sin diagnóstico.

### **V.3.3.- Resultados de la prueba de provocación antigénica**

Ya Blackey en 1873 se provocó una crisis de asma tras inhalar polen, pero hay que esperar a nuestro siglo para que, al compás del desarrollo de las técnicas de estudio de la función respiratoria, comiencen a aparecer trabajos científicos al respecto. Por las molestias que entraña su realización no se considera una técnica de exploración rutinaria, y no se emplea salvo en caso de duda razonable respecto al diagnóstico, pero sí es una herramienta valiosa para el estudio del asma y de la hiperreactividad bronquial (221).

El test de provocación bronquial con alérgeno se consideraba la prueba más importante para descartar o asegurar que un individuo tenía asma por sensibilización a un determinado alérgeno. En nuestro trabajo hemos encontrado que el 69.8 % de los asmáticos respondía negativamente a la prueba. Además ésta resultó inútil para discriminar a los rinoconjuntivíticos de los asmáticos. Por otra parte, mostró menos utilidad que la prueba de provocación conjuntival para confirmar el diagnóstico.

Observamos una buena correlación entre el resultado de la provocación bronquial y la gravedad del asma durante el año previo a la primera consulta, tanto durante la primavera como fuera de ella (  $p < 0.01$  ). Esta relación se mantuvo durante la segunda primavera (  $p < 0.01$  ) e incluso durante la tercera: los asmáticos que habían respondido a la prueba de provocación con *Lolium*, realizada al diagnóstico, seguían presentando asma moderado o severo mas frecuentemente, incluso después de tres años de inmunoterapia (  $p < 0.05$  ). Por el contrario, los asmáticos no respondedores a dicha prueba al cabo de tres años estaban asintomáticos o presentaban asma leve con mas frecuencia que los respondedores (  $p < 0.05$  ).

La prueba de provocación bronquial antigénica en polínicos ha dado resultados controvertidos. Por ejemplo, Fish y cols. (306) no encontraron diferencias significativas entre asmáticos y rinoconjuntivíticos sensibilizados a polen de ambrosia, cuando les provocaban con dicho antígeno y, aunque los segundos precisaban más dosis para experimentar una caída de la función respiratoria, observaron bastante solapamiento entre los dos grupos. Ahmed y cols. (307) realizaron provocaciones bronquiales con polen de ambrosia a 16 asmáticos y 11 rinoconjuntivíticos y encontraron que respondían a la misma el 63% de los primeros y el 45% de los segundos. En ambos trabajos se sugería que las diferencias observadas, entre el laboratorio y la clínica, se deberían a que durante la primavera se produce una exposición continuada al polen que no es comparable con el efecto ocasionado por una exposición puntual, ni reproducible en el laboratorio. Sin embargo, Crimi y cols.(308) estudiaron a 15 pacientes sensibilizados al polen de Parietaria y les realizaron provocaciones bronquiales con dicho antígeno. Después, vieron que la severidad de los síntomas de asma durante la primavera se relacionaba con la intensidad de la respuesta inicial o dual durante la provocación bronquial antigénica.

Encontramos mayor respuesta, en la prueba de provocación con Lolium, entre los sujetos que presentaban antecedentes de asma de esfuerzo (  $p < 0.01$ ). Se trataría de sujetos con un grado apreciable de inflamación su mucosa bronquial que responderían con facilidad cuando, al inhalar el antígeno al que están sensibilizados, se reactivara el proceso.

Así mismo observamos una buena correlación entre la respuesta a la prueba de provocación bronquial antigénica y la dermatitis atópica (  $p < 0.001$ ), consecuencia probable de la estrecha correlación observada entre la prueba de provocación bronquial y la prueba de provocación con metacolina, que mas adelante comentaremos.

También observamos una buena correlación entre el resultado de la provocación bronquial y la gravedad del asma durante el año previo a la primera consulta, tanto durante la primavera como fuera de ella (  $p < 0.01$  ). Esta relación se siguió observando durante la segunda primavera (  $p < 0.01$  ).

No observamos ninguna correlación con otras pruebas efectuadas, tanto in vivo (prick-end, provocación conjuntival ) como in vitro ( eosinofilia, nivel de IgE total y específica). Algunos autores sí que han encontrado relación entre el tamaño de la pápula ( en prick o en intradermorreacción ), el nivel de IgE específica y la positividad en la prueba de provocación bronquial (309), pero suelen ser trabajos que comparan individuos sensibilizados con otros que no lo están, lo que no era nuestro propósito.



### **V.3.4.-Comparación entre las tres pruebas de provocación bronquial**

En general se dice que los asmáticos pueden reaccionar a cualquier estímulo broncoconstrictor, pero en realidad no se comportan así. Por ejemplo, con dos sustancias como la histamina y la metacolina se encuentran resultados similares si se emplean protocolos de inhalación continua (195), pero no si se recurre a métodos dosimétricos. Los niños especialmente responden con mas facilidad a la histamina que a la metacolina (310). Otros estímulos broncoconstrictores, como la inhalación de aire frío, también muestran una discreta correlación con el test de metacolina (311).

En un estudio realizado por Chatman y cols. (312) con 15 asmáticos y 10 sujetos normales a los que se sometió a provocación con histamina, metacolina y esfuerzo físico, se observó una buena correlación entre las dos primeras pruebas, aunque la metacolina discriminaba mejor a los asmáticos de los normales, mientras que solo la mitad de los asmáticos respondió a la provocación con ejercicio. Parece que la correlación entre la provocación con metacolina y con esfuerzo, al igual que con otro tipo de estímulos, sería mayor cuanto más severa fuese la hiperreactividad bronquial del individuo explorado. Así, Foresi y cols. (313), estudiando a 25 asmáticos, encuentran buena correlación entre la respuesta positiva al ejercicio físico, la nebulización con agua destilada y la metacolina siempre que se tratara de pacientes que hubieran respondido a dosis muy bajas de esta última. Clough y cols. (314), realizan test de metacolina y prueba de provocación con ejercicio físico a 30 niños con sibilancias y encuentran que, en aquellos en los que existe una base atópica y la hiperreactividad bronquial es más acusada, hay cierta correlación entre las dos pruebas y concluyen que la asociación entre los dos estímulos es compleja y reflejaría diferentes vías de estimulación de la broncoconstricción.

En nuestro trabajo se observó una buena correlación entre la respuesta positiva a la prueba de provocación con Lolium y el test de metacolina (  $p < 0.01$ ). Estos resultados son similares a los encontrados por otros autores. Ya Tiffeneau, en 1958, decía que el grado de

sensibilidad de los bronquios al alérgeno dependería de dos factores: el nivel de alergia del individuos y el nivel de sensibilidad del bronquio a mediadores broncoconstrictores. Bruce y cols. (315) observaron que los pacientes con rinitis alérgica o con asma, test cutáneos y respuesta a la histamina similares, tenían la misma caída de la función respiratoria tras la provocación con el antígeno al que estaban sensibilizados. Killian y cols. (316) vieron que existía una relación inversa entre el nivel de la reactividad bronquial inespecífica y la intensidad de la respuesta a la provocación antigénica, sugiriendo que el asma alérgico se provocaría mas fácilmente cuanto más marcada fuese la hiperreactividad bronquial inespecífica del sujeto. Cockcroft y cols. (317) estudiaron a 26 asmáticos a los que realizaron pruebas cutáneas (técnica del punto final) y test de provocación con histamina y con el antígeno al que estaban sensibilizados. De los resultados obtenidos dedujeron una ecuación de regresión lineal en la que el logaritmo decimal de la  $PC_{20}$ , encontrada tras la provocación con el antígeno, era igual al producto de la  $PC_{20}$  obtenida con la inhalación de histamina y la concentración del antígeno que provocaba una pápula de 2 mm. Estos resultados tan precisos no han sido refrendados por otros autores, aunque sí se ha confirmado la existencia de una relación estrecha entre la hiperreactividad bronquial inespecífica y el grado de respuesta alérgica. Así, Busse y cols. (318) exploraron a pacientes con rinitis alérgica a los que se provocaba con el antígeno al que estaban sensibilizados, midiendo a continuación la liberación de histamina ocasionada. Observaron una estrecha relación entre la magnitud de la respuesta alérgica, reflejada por la mayor liberación de histamina medida tras la inhalación del antígeno, y la respuesta a una provocación basal con histamina inhalada. Dedujeron que tanto los estímulos específicos como los inespecíficos eran responsables de la hiperreactividad bronquial final. Abundando en estos conceptos, Crimi y cols. (319) estudiaron a 11 pacientes con rinitis o asma polínico. Antes y después de la primavera les sometieron a test de metacolina y provocación con polen un día y al siguiente, monitorizando también los niveles de IgE específica en esa segunda ocasión. Durante toda la primavera se hicieron registros diarios de peak-flow y de la clínica. Para controlar sus síntomas de asma 6 de los pacientes necesitaron beclometasona inhalada y uno metil-prednisolona oral. Una vez concluido el estudio observaron que este grupo, que había recibido corticoides, no mostraba cambios significativos en la respuesta a la provocación bronquial con antígeno o metacolina antes y después de la primavera, y el nivel de IgE

específica también permanecía inalterado, mientras que los 5 pacientes que no recibieron corticoides tenían una respuesta inicial y tardía mayor tras la provocación con antígeno después de la primavera que antes de esta estación. Los niveles de IgE específica también habían aumentado, mientras que el test de la metacolina permaneció inalterado. Parece que la exposición natural al polen, en pacientes sensibilizados, daría lugar a una inflamación bronquial de más o menos larga duración que se impediría con el tratamiento corticoideo. Sin embargo, dicha exposición sería lo suficientemente corta para no alterar excesivamente el epitelio respiratorio y dar lugar a cambios en la respuesta a la provocación con metacolina. Si la exposición al polen fuese muy intensa y prolongada, y no se tratara al individuo con antiinflamatorios, cabría esperar que la inflamación bronquial mediada por IgE también se intensificara y prolongara, dando lugar a un aumento de la sensibilidad bronquial a la metacolina después de la estación polínica.

En nuestro trabajo no nos pareció oportuno objetivar, durante la provocación antigénica, la existencia de una reacción tardía, tanto por una cuestión ética como por dificultades de infraestructura. Se ha especulado con la posibilidad de que la hiperreactividad bronquial inespecífica se relacionara solo con la respuesta tardía tras la provocación con antígeno, pero eso no parece ser del todo cierto, por lo menos entre los polínicos. Paggiaro y cols. (320) estudiaron, fuera de la primavera, a 27 asmáticos sensibilizados a polen de gramíneas. Realizaron test de metacolina, de provocación antigénica, pruebas cutáneas, IgE total e IgE específica. Se observó respuesta positiva a la metacolina en 21 de los 27 pacientes. Todos respondieron a la provocación con *Phleum pratensis*, 16 presentaron respuesta inicial y 11 inicial y tardía. Observaron que la duración de los síntomas, la respuesta a la metacolina, el test cutáneo con *Phleum pratensis* y los niveles de IgE específica fueron similares entre el grupo que presentó reacción dual y el que solo mostró reacción inmediata y solo se constató una relación significativa entre el grado de respuesta a la metacolina y el obtenido tras la provocación bronquial inmediata.

## **VI. CONCLUSIONES**

Al valorar diferentes parámetros clínicos y estudios complementarios que pudiesen servir como pronóstico de la evolución patocrónica de las polinosis infantiles, en especial hacia el asma, hemos llegado a las conclusiones que a continuación se detallan.

1º.- Los datos que distinguieron a los niños asmáticos polínicos de los que sufrían únicamente rinoconjuntivitis polínica fueron los siguientes: un mayor predominio del sexo masculino, más antecedentes personales de asma fuera de la estación polínica, cifras de IgE total más altas y más frecuente sensibilización a otros neuromoalergenos.

2º.-No se encontraron diferencias entre los pacientes con asma polínica y los que presentaban solo rinoconjuntivitis en relación con los datos clínicos y analíticos que a continuación se detallan:

-Aspectos clínicos:

- edad de comienzo del cuadro
- tiempo de evolución de los síntomas
- presencia de dermatitis atópica
- antecedentes personales y familiares de atopia
- padres fumadores

-En cuanto a los aspectos analíticos que tampoco fueron útiles para diferenciar las dos situaciones de la polinosis que hemos estudiado, se encuentran:

- eosinófilos circulantes
- IgE específica
- grado de positividad de la prueba de prick-end
- anomalías radiológicas de los senos paranasales
- respuesta a la prueba de provocación conjuntival
- respuesta a las pruebas de provocación bronquial

**3°.-** Para confirmar el diagnóstico de polinosis resultó mas útil la prueba de provocación conjuntival que la bronquial. Además, los sujetos que respondieron con dosis más bajas presentaron síntomas de conjuntivitis más intensos en primavera. Ello podría servir para programar las prácticas profilácticas en estos pacientes.

**4°.-** En cuanto a la utilidad de la prueba de provocación con metacolina como indicador del momento evolutivo de la polinosis y de su posible evolución , hemos podido observar los siguientes hechos:

**a.-** No se encontraron diferencias de respuesta respecto al sexo, edad de consulta, edad de comienzo de la polinosis, forma de comienzo de la misma, años de evolución, antecedentes familiares de alergia y presencia de padres fumadores.

**b.-** La primera prueba resultó más positiva en los niños que habían presentado dermatitis atópica y tenían antecedentes familiares y personales de asma (aunque este último hecho no fue estadísticamente significativo).

**c.-** Ninguna de las dos pruebas de provocación con metacolina (realizadas al diagnóstico y a los tres años de seguimiento) resultaron útiles para diferenciar a los niños con rinoconjuntivitis de los asmáticos.

**d.-** La primera prueba, realizada al diagnóstico, tampoco nos ayudó a pronosticar la evolución hacia el asma de los niños que inicialmente solo presentaban rinoconjuntivitis.

**e.-** Los asmáticos que respondieron con dosis bajas de metacolina en la primera prueba, presentaron asma moderado o severo en la siguiente primavera. Los que respondieron a dosis bajas de metacolina en la prueba realizada a los tres años de seguimiento y de tratamiento con inmunoterapia, seguían presentando asma.

**5°.-** El interes de la prueba de provocación con ejercicio fisico puede concretarse, en el tema que nos ocupa, en los siguientes aspectos:

**a.-** Con esta prueba no se encontraron diferencias significativas respecto al sexo, edad de comienzo de la polinosis, edad en la primera consulta, forma de comienzo de la enfermedad, tiempo de evolución, antecedentes personales de alergia, presencia de dermatitis atópica, antecedentes familiares de alergia o de asma o presencia de padres fumadores.

**b.-** La prueba practicada al diagnóstico fue más frecuentemente positiva entre los niños que tenían antecedentes de asma de esfuerzo.

**c.-** Despues de 3 años de seguimiento la prueba resultó mas frecuentemente positiva entre los que continuaban teniendo asma fuera de la primavera y asma moderado o severo en primavera. Ninguno de los que estaba sin asma respondió a esta prueba de provocación con ejercicio, que mostró ser muy específica, aunque poco sensible.

**6°.-** Respecto a la prueba de provocación antigénica con Lolium

**a.-** Resultó inútil para discriminar a los polínicos asmáticos de los rinoconjuntivíticos, en el momento de la primera consulta.

**b.-** Los niños que respondieron a la prueba de provocación antigénica tenían mas antecedentes de asma de esfuerzo y presencia de dermatitis atópica.

**c.-** Los asmáticos que respondieron a las dosis más bajas de Lolium habían presentado más frecuentemente asma durante la primavera y fuera de ella, en el año previo a la primera consulta. Al año siguiente, también se observó mayor presencia de asma durante la primavera en estos mismos niños.

d.- Los asmáticos no respondedores presentaban asma leve o estaban asintomáticos después de tres años de inmunoterapia.

e.- Existió una buena correlación entre la respuesta a la metacolina y la respuesta a la provocación antigénica.

7º.- **Como resumen** podemos decir que para alcanzar un completo conocimiento de las polinosis en el niño, y en especial del pronóstico sobre su evolución, se requieren más amplios trabajos que profundicen en sus aspectos fisiopatológicos, patogénicos y genéticos.

En nuestra experiencia, y a nivel de los conocimientos actuales, pensamos que la forma más adecuada de pronosticar la evolución desfavorable de la polinosis se basaría en la existencia de los siguientes hechos: sexo masculino, antecedentes personales de asma fuera de la primavera, cifras de IgE elevada en otras estaciones y presencia de sensibilización a otros neumoaergenos.

Del mismo modo, para prever la evolución clínica del asma en las polinosis deberíamos basarnos fundamentalmente en las pruebas de provocación bronquial con metacolina y con ejercicio físico. Como la provocación con antígeno implica ciertas dificultades y riesgos, y dada su buena correlación con la prueba de provocación con metacolina, creemos que no debe practicarse de rutina, quedando reservada para casos especiales



## **VII.-BIBLIOGRAFIA**

- 1.-Libro Blanco de las Enfermedades Alérgicas en España. Edit. por la Sociedad Española de Alergia e Inmunología Clínica, 1983; pags. 35-65
- 2.-Aberg N, Engström I, Lindberg U. Allergic diseases in swedish school children. *Acta Paediatr Scand* 1989; 78: 246-252
- 3.-Enguidanos M, Campos A. Estudio epidemiológico comparativo de enfermedades alérgicas en el medio rural y urbano en el país valenciano. Comunicación al XIV Congreso Nacional de la SEA e IC (Abstrac.) 1984
- 4.-American Thoracic Society. *Am Rev Respir Dis* 1962; 85: 762-768
- 5.-International Consensus Report on Diagnosis and Management of Asthma. *Allergy* 1992; 47 (Suppl.13): 1-5
- 6.-Dolovich J, O'byrne PO, Hargreave FE. Airway hyperresponsiveness: mechanisms and relevance. *Pediatr Allergy Immunol* 1992; 3:163-170
- 7.-Cooxson WOCM, Musk AW, Ryan G. Associations between asthma history, atopy, and non-specific bronchial responsiveness in young adults. *Clin Allergy* 1986; 16: 425-432
- 8.-Burney PGJ, Britton JR, Chinn S Tattersfield AE, Papacosta AO, Kelson MC, Anderson F, Corfield DR Descriptive epidemiology of bronchial reactivity in an adult population; results from a community study. *Thorax* 1987;42: 38-44
- 9.-Peat J. Britton WJ, Salome CM, Woolcock AJ. Bronchial hyperresponsiveness in two populations of australian school-children. III. Effect of exposure to environmental allergens. *Clin Allergy* 1987; 17: 291-300

- 10.-Cartier A, Thomson NC, Frith PA, Roberts R, Hargreave FE. Allergen-induced increase in bronchial responsiveness to histamine: relationship to the late asthmatic response and change in airway caliber. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 70: 170-171
- 11.-Woolcock AJ, Colman MH, Jones MW. Atopy and bronchial reactivity in Australian and Melanesian population. *Clin Allergy* 1978; 8: 155-164
- 12.-Sibbald B, Horn MEC, Brain EA, Gregg I. Genetic factors in childhood asthma. *Thorax* 1980; 35: 671-674
- 13.-Stenius-Aarniala B. The role of infection in asthma. *Chest* 1987; 91: 157S-160S
- 14.-Mitchell I, Inglis H, Simpson H. Viral infections in wheezy bronchitis and asthma in children. *Arch Dis Child* 1976; 51: 707-711
- 15.-Horn MEC, Brain EA, Gregg I, Inglis JM, Yealland SJ Taylor P. Respiratory viral infection and wheezy bronchitis in childhood. *Thorax* 1979; 34: 23-28
- 16.-Empey DW, Laitinen LA, Jacobs L, Gold WM, Nadel JA. Mechanisms of bronchial hyperreactivity in normal subjects after upper respiratory tract infection. *Am Rev Respir Dis* 1976; 113: 131-139
- 17.-Little JA, Hall WJ, Douglas RG, Mudholker GS, Patel K. Airway hyperreactivity and peripheral airway dysfunction in influenza A infection. *Am Rev Respir Dis* 1978; 118: 295-303
- 18.-Jenkins CR, Breslin ABX. Upper respiratory tract infections and airway reactivity in normal and asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130: 879-883

- 19.-Halperin SA, Eggleston PA, Hendley JA, Suratt PM, Groschel DH, Gwaltney JM. Pathogenesis of lower respiratory tract symptoms in experimental rhinovirus infection. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 806-810
- 20.-Halperin SA, Eggleston PA, Beasley P, Hendley JA, Groschel DH, Gwaltney JM.. Exacerbations of asthma in adults during experimental rhinovirus infection. *Am rev respir Dis* 1985; 132: 976-980
- 21.-Pullan CR, Hey EN. Wheezing, asthma and pulmonary dysfunction 10 years after infection with respiratory syncytial virus in infancy. *Br Med J* 1982; 284: 1665-1669
- 22.-Weiss ST, Tager IB, Muñoz A, Speizer FE. The relationship of respiratory infections in early childhood to the occurrence of increased level of bronchial responsiveness and atopy. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131: 573-578
- 23.-Zweiman B, Schoenwetter WF, Pappano JE. Patterns of allergic respiratory disease in children with a past history of bronchiolitis. *J Allergy* 1971; 48: 283-287
- 24.-Kava T. Acute respiratory infections, influenza vaccination and airway reactivity in asthma. *Eur J Respir Dis* 1987; 70 (Suppl. 150): 7-38
- 25.-Laitinen LA, Heino M, Laitinen A, Kava T, Haahtela T. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131: 566-606
- 26.-Eggleston PA, Sobotka AK, Schleimer R, Lichtenstein LA. Interaction between hyperosmolar and IgE-induced histamine release from basophils and mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 1983; 71 (Suppl.): 93-98
- 27.-Zoler ML. Immune-complexes initiate RSV pathology. *JAMA* 1983; 249: 447-451

- 28.-Welliver RC, Kaul TN, Ogra PL. The appearance of cell-bound IgE in respiratory-tract epithelium after respiratory-syncytial-virus infection. *N Engl J Med* 1980; 303: 1198-1202
- 29.-Welliver RC, Wong DT, Sun M, Middleton E, Vaugham RS, Ogra PL. The development of respiratory syncytial virus specific IgE and the release of histamine in nasopharyngeal secretion. *N Engl J Med* 1981; 305: 841-846
- 30.-Busse WW, Swenson CA, Borden EC, Treuhaft MW, Dick EC. The effect of influenza A virus on leukocyte histamine release. *J Allergy Clin Immunol* 1983; 71: 382-388
- 31.-Busse WW, Anderson C, Dick EC, Warshauer D. Reduced granulocyte response to isoproterenol, histamine and prostaglandin E<sub>1</sub>, after in vitro incubation with rhinovirus 16.- *Am Rev Respir Dis* 1980; 122: 641-645
- 32.-O'Hollaren MT, Yunginger JW, Offord KP, Somers MJ, O'Connell EJ, Ballard DJ, Sachs MI. Exposure to an aeroallergen as possible precipitating factor in respiratory arrest in young patients with asthma. *N Engl J Med* 1991; 324: 359-363
- 33.-Anto JM, Sunyer J. A point source asthma outbreak. *Lancet* 1986; i: 900-903
- 34.-Molfino NA, Slutsky AS, Zamel N. The effects of air pollution on allergic bronchial responsiveness. *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 667-672
- 35.-Mullen JBM, Wiggs BR, Hogg JC, Pare PD. Nonspecific airway reactivity in cigarette smokers. Relationship to airway pathology and baseline lung function. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133: 120-125
- 36.-Simonsson BG, Rolf C. Bronchial reactivity to methacholine in 10 nonobstructive heavy smokers before and up to one year after cessation of smoking. *Eur J Respir Dis* 1982; 63: 526-534

- 37.-Venables KM, Topping MD, Howe W, Luzynuska CM, Hawkins R, Newman N, Taylor AJ. Interaction of smoking and atopy in producing specific IgE antibody against a hapten protein conjugate. *Br Med J* 1985; 290: 201-204
- 38.-Taylor RG, Gross E, Joyce H, Holland NB. Smoking, allergy and the differential white blood cell count. *Thorax* 1985; 40: 17-22
- 39.-Taylor RG, Joyce H, Gross E, Holland F, Pride NB. Bronchial reactivity to inhaled histamine and annual rate of decline in FEV<sub>1</sub> in male smokers and ex-smokers. *Thorax* 1985; 40: 9-15
- 40.-Kraan J, Koeter GH, Van der Mark THW, Boorsma M, Kkler J, Suiter HJ, De Vries K. Dosage and time effects of inhaled budesonide on bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137: 44-48
- 41.-Murray AB, Morrison BJ. The effect of cigarette smoke from the mother on bronchial responsiveness and severity of symptoms in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77: 575-81
- 42.-O'Connor GT, Weiss ST, Tager IB, Speizer FE. The effect of passive smoking on pulmonary function and non-specific bronchial responsiveness in a population based sample of children and young adults. *Am Rev Res Dis* 1987; 135: 800-804
- 43.-Martinez FD, Antognoni G, Macri F, Bonci E, Midulla F, De Castro G, Ronchetti R. Parental smoking enhances bronchial responsiveness in nine-year-old children. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: 518-523
- 44.-Hargreave FE, Dolovich J, O'Byrne PM, Ramsdale EH, Daniel EE. The origin of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 78: 825-832

- 45.-Metzger WJ, Zavala D, Richerson HB, Moseley P, Iwamota P, Monick M, Sjoerdama k, Hunninghake GM. Local allergen challenge and bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic lungs. *Am rev Respir Dis* 1987; 135: 433-440
- 46.-Twentyman OP, Holgate ST. The temporal development of increased bronchial responsiveness following allergen and its relationship to the late asthmatic reaction. *Am rev respir Dis* 1988; 137: 135-140
- 47.-Pruzansky JJ, Patterson R. The diisopropylfluorophosphate inhibitable step in antigen-induced histamine release from human leucocytes. *J Immunol* 1975; 114: 939-943
- 48.-Hirata F, Axelrod J. Phospholipid methylation and biological signal transmission. *Science* 1980; 209: 1082-1090
- 49.-Ishizaka T, Conrad DH, Huff TF, Metcalfe DP, Stevens RL, Lewis RA. Unique feature in vitro human basophilic granulocytes developping in vitro culture. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985; 77: 137-143
- 50.-White JR, Ishizaka T, Ishizaka K, Shafi R. Direct demostration of increased intracellular concentration of free calcium as measured by Quin-2 stimulated rat peritoneal mast cells. *Pro Natl Acad Sci U.S.A.* 1984; 81: 3978-3982
- 51.-White JR, Pluznik DH, Ishizaka K, Ishizaka T. Antigen-induced increase in protein kinase C activity in plasma membrane of mast cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1985; 82: 8193-8197
- 52.-Wenzel SE, Fowler AA, Schwartz LB. Activations of pulmonary mast cells by bronchoalveolar allergen. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137: 1002-1008

- 53.-Metzger WJ, Richerson HB, Warden K, Monick M, Hunninghake GW. Bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic patients following allergen provocation. *Chest* 1986; 99: 477-483
- 54.-Wardlaw AJ, Dunnette S, Gleish GJ, Collins JV, Kay AB. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in mild asthma; relationship to bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137: 62-69
- 55.-Casale TB, Wood D, Richerson HB, Zehr B, Zabala D, Hunninghake GW. Direct evidence of a role for mast cells in the pathogenesis of antigen-induced bronchoconstriction. *J Clin Invest* 1987; 80: 1507-1511
- 56.-Lee TH, Assouffi Bk, Kay AB. The link between exercise respiratory heat exchange and mast cell in bronchial asthma. *Lancet* 1983; i: 520-522
- 57.-Díaz P, González MC, Galleguillos FR, Ancic P, Cromwell O, Shephard D, Durham SR, Gleich GJ, Kay AB. Leukocytes and mediators in bronchoalveolar lavage during allergen-induced late phase asthmatic reactions. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 1383-1389
- 58.-Cuss FM, Dixon CM, Barnes PJ. Effects of inhaled platelet activating factor on pulmonary function and bronchial responsiveness in man. *Lancet* 1986; ii: 189-192
- 59.-Smith LJ, Rubin AH, Patterson R. Mechanism of platelet activating factor-induced bronchoconstriction in humans. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137: 1015-1019
- 60.-Kay AB, Díaz P, Carmichael J, Grant IWB. Corticosteroid-resistant chronic asthma and monocyte complement receptors. *Clin Exp Immunol* 1981; 44: 576-580
- 61.-Horn BR, Robin ED, Theodore J, Van Kessel A. Total eosinophil counts in the management of asthma. *N Engl J. Med* 1975; 292: 1152-1155



- 62.-Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Eviander Y, Venge P, Alstedt S, Simony-Lafontaine J, Godard P. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med* 1990; 323: 1033-1039
- 63.-Durham SR, Kay AB. Eosinophils, bronchial hyperreactivity and late-phase asthmatic reactions. *Clin Allergy* 1985; 15: 411-418
- 64.-Taylor KJ, Kuks AR. Peripheral blood eosinophil counts and bronchial asthma. *Thorax* 1987; 42: 452-456
- 65.-Griffin E, Hakansson L, Formgren H, Jorgensen J, Peterson C, Venge P. Blood eosinophil number and activity in relation to lung function in patients with asthma and eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 548-557
- 66.-Evans PM, O'Conner BJ, Fuller KF, Chung KF, Barnes PJ. Effect of inhaled budesonide on eosinophil density in asthma. *Br J Clin Pharmacol* 1991; 31: 616P
- 67.-Ferguson AC, Wong WM. Bronchial hyperresponsiveness in asthmatic children. Correlation with macrophages and eosinophils in bronchoalveolar fluid. *Chest* 1989; 96: 988-991
- 68.-Wardlaw AJ, Dunnette S, Gleich GJ, Collins JV, Kay AB. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with asthma. *Am rev Respir Dis* 1988; 137: 62-69
- 69.-Djukanovic R, Wilson JW, Britten KM, Wilson SJ, Walls AF, Roche WR, Howarth PH, Holgate ST. Quantification of mast cells and eosinophils in the bronchial mucosa of symptomatic atopic asthmatics and healthy control subjects using immunochemistry. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 863-871
- 70.-Kay AB. Lymphocytes in asthma. *Resp Med* 1991; 85: 87-90

- 71.-Beasley R, Roche WR, Roberts JA, Holgate ST. Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 806-907
- 72.-Laitinen A, Laitinen LA. cellular infiltrates in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am rev Respir Dis* 1991; 143: 1159-1160
- 73.-Heard BE, Jeffery PK, Kay AB. Quantitation on mast cells and eosinophils in the bronchial mucosa of symptomatic atopic asthmatics and healthy control subjects using immunochemistry. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 1200-1201
- 74.-Jeffery PK, Wardlaw AJ, Nelson FC, Collins JV, Kay AB. Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am rev Respir Dis* 1989; 140: 1745-1753
- 75.-Lozewicz S, Wells C, Gómez C, Ferguson H, Richman P, Devalia J, Davies RJ. Morphological integrity of the bronchial epithelium in mild asthma. *Thorax* 1990; 45: 12-15
- 76.-Lozewicz S, Gómez E, Ferguson H, Davies RJ. Inflammatory cells in the airways in mild asthma. *Br Med J* 1988; 297: 1515-1516
- 77.-Gibson PG, Manning PJ, O'Byrne PM, Girgis-Gabardo A, Dolovich J, Denburg JA, Hargreave FE. Allergen-induced asthmatic responses. relationship between increases in airway responsiveness and increases in circulating eosinophils, basophils and their progenitors. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 331-335
- 78.-Laitinen LA, Laitinen A, Heino M, Haahtela T. Eosinophilic airway inflammation during exacerbation of asthma and its treatment with inhaled corticosteroids. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 423-427

- 79.-Khalife J, Capron M, Cesbron JY, Taelman H, Prin L, Capson A. Role of specific IgE antibodies in peroxidase (EPO) release from human eosinophils. *J Immunol* 1986; 137: 1659-1664
- 80.-Gleich GJ, Frigas E, Loegering DA, Wasson DL, Steinmuller D. Cytotoxic properties of the eosinophil major basic protein. *J Immunol* 1979; 123: 2925-2927
- 81.-Lam S, LeRiche J, Phillips D, Cahn-Yeung M. Cellular and protein changes in bronchial lavage fluid after late asthmatic reaction in patients with red cedar asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 80: 44-50
- 82.-Henderson WR, Chi EY, Klebanoff SJ. Eosinophil peroxidase-induced mast cell secretion. *J Exp Med* 1980; 152: 265-279
- 83.-Lee T, Lenihan DJ, Malone B, Roddy LL, Wasserman SI. Increased biosynthesis of platelet-activating factor in activated human eosinophils. *J Biol Chem* 1984; 259: 5526-5530
- 84.-Borgeat P, Fruteau de Laclos B, Ravinovitch H, Picard S, Braquet P, Hebert J, Laviolette M. Eosinophil-rich human polymorphonuclear leukocyte preparations characteristically release leukotriene C4 on ionophore A 23187 challenge. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 74: 310-315
- 85.-Cibulas W Jr, Murlas CG, Miller ML, Vinegar A, Schmidt DJ, McKay RT. Toluene-diisocyanate-induced airway hyperreactivity and pathology in the guinea pig. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77: 828-834
- 86.-Carroll M, Durham SR, Wash GM, Kay AB. Activation of neutrophils and monocytes after allergen- and histamine-induced bronchoconstriction. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 75: 290-296

- 87.-Moqbel R, Durham SR, Shaw RJ, Walsh GM, MacDonald AJ, MacKay JA, Carroll MP, Kay AB. Enhancement of leucocyte cytotoxicity after exercise-induced asthma. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133: 609-613
- 88.-Lee TH, Nagy L, Nagakura T, Walport MJ, Kay AB. The identification and partial characterization of an exercise-induced neutrophil chemotactic factor in bronchial asthma. *J Clin Invest* 1982; 69: 889-99
- 89.-Maestrelli P, Tsai JJ, Cromwell O, Kay AB. The identification and partial characterization of an human mononuclear cell-derived neutrophil chemotactic factor apparently distinct from IL-1, IL-2, GM-CSF, TNF and IFN-gamma. *Immunology* 1988; 64: 219-225
- 90.-Durham SR, Dawes J, Kay AB. Platelets in asthma. *Lancet* 1985; 2 (8445): 36
- 91.-De Monchy JG, Aalbers R, Timens W. The clinical relevance of bronchial biopsies in asthma. *Respir Med* 1993; 87: 23-24
- 92.-Timonen T, Stenius-Aarnala B. Natural killer cell activity in asthma. *Clin Exp Immunol* 1985; 59: 85-90
- 93.-Corrigan CJ, Kay AB. CD4 T lymphocyte activation in acute severe asthma. Relationship to disease severity and atopic status. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 970-077
- 94.-Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW, Beasley CR, Twentyman OP, Howarth PH, Holgate ST. Mucosal inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 434-457
- 95.-Mattoli S, Soloperto M, Marini M, Fasoli A. Levels of endothelin in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with symptomatic asthma and reversible airflow obstruction. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 376-384

- 96.-Vanhoutte PM. Epithelium-derived relaxing factors and bronchial reactivity. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83: 855-861
- 97.-Shepard D, Thompson JE, Scypinski L, Dusser D, Nadel JA, Borson B. Toluene diisocyanate increase airway responsiveness to substance P and decrease airway neutral endopeptidase. *J Clin Invest* 1988; 81: 1111-1115
- 98.-Willis WD, Grossman RG. Medical neurobiology: neuroanatomical and neurophysiological principles basic to clinical neuroscience. 3nd. ed. St Louis: The C.V. Mosby Co., 1981
- 99.-Eccles JC. The physiology of synapses. New York: Academic Press, Inc., 1981
- 100.-Ganong WF. Review of medical physiology. 4nd. ed. Appleton and Lange, 1989, pags. 67-93
- 101.-Morton IKM, Halliday J. Adrenoceptors in smooth muscle. En Kunos G: Adrenoceptors and catecholamine action. New York: John Wiley & Sons, 1981
- 102.-Szentivanyi A. The beta-adrenergic theory of the atopic abnormality in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1968; 42: 203-232
- 103.-Mitrius JC, U'Pritchard DC. Regulation of alfa-2 adrenoceptors by nucleotides, ions and agonists: comparison in cells of neural and noneural origin. En Coper DMF & Seamon KB: Advances in cyclic nucleotide and protein phosphorylation, vol 19. New York: Raven Press, 1985
- 104.-Barnes PJ, Skoogh BE, Brown JK, Nadel JA. Activation of alfa-adrenergic responses in tracheal smooth muscle; a post-receptor mechanism. *J Appl Physiol* 1983; 54: 1469-1476
- 105.-Barnes PJ, Ind PW, Dollery CT. Inhaled prazosin in asthma. *Thorax* 1981; 36: 378-381

- 106.-Leff AR. Endogenous regulation of bronchomotor tone. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137: 1198-1216
- 107.-Barnes PJ, Basbaum CB, Nadel JA. Autoradiographic localization of autonomic receptors in airway smooth muscle; marked differences between large and small airways. *Am Rev Respir Dis* 1983; 127: 758-762
- 108.-Douglas JS. Receptors on target cells. Receptors on airway smooth muscle. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: S123-S126
- 109.-Barnes PJ. Muscarinic receptor subtypes in airways. *Eur Respir J* 1993; 6: 321-328
- 110.-MacLagan J. Presynaptic control of airway smooth muscle. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: S54-S57
- 111.-Barnes PJ. Neural control of human airways in health and disease. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134: 1289-1314
- 112.-Kallenbach JM, Webster T, Dowdeswell R, Reinach SG, Millar Scott RN, Swi S. Reflex heart rate control in asthma. *Chest* 1985; 87: 644-648
- 113.-Boushey HA, Holtzman MJ, Sheller JR, Nadel JA. Bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 1980; 121: 389-413
- 114.-Minette PA, Barnes PJ. Prejunctional inhibitory muscarinic receptors on cholinergic nerves in human and guinea pig airways. *J Appl Physiol* 1988; 64: 2532-2537
- 115.-Barnes PJ. Molecular biology and respiratory disease.5. Molecular biology of receptors: implications for lung disease. *Thorax* 1990; 45: 482-488

- 116.-Holgate ST, Cushley MJ, Mann JS, Hughes P, Church MK. The action of purines on human airways. *Arch Int Pharmacodyn* 1986; 280 (Suppl): 240-252
- 117.-Cushley MJ, Holgate ST. Adenosine induced bronchoconstriction in asthma; role of mast cell mediator release. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 75: 272-278
- 118.-Man JS, Holgate ST, Renwick AG, Cushley MJ. Airway effects of purine nucleosides and nucleotides and release with bronchial provocation in asthma. *J Appl Physiol* 1986; 61: 1667-1676
- 119.-Fredholm BB. Release of adenosine from rat lung by antigen and compound 48/80. *Acta Physiol Scand* 1981; 111; 507-508
- 120.-Peters SP, Schulman ES, Schleimer RP, MacGlashan DW Jr, Newball HH, Lichtenstein LM. Dispersed human lung cells. Pharmacologic aspects and comparison with human lung tissue fragments. *Am Rev Respir Dis* 1982; 126: 1034-1039
- 121.-Uddman R, Sundler F. Neuropeptides in the airways: a review. Sites and synthesis. *Am rev Respir Dis* 1987; 136: 53-58
- 122.-Lammers JWJ, Barnes PJ, Chung KF. Nonadrenergic, norcholinergic airway inhibitory nerves. *Eur Respir J* 1992; 5: 239-246
- 123.-Palmer JB, Cuss FM, Barnes PJ. VIP and PHM and their role in nonadrenergic responses in isolated human airways. *J Appl Physiol* 1986; 61: 1322-1328
- 124.-Martling CR. Sensory nerves containing tachykinins and CGRP in the lower airways. *Acta Physiol Scand* 1987; 133 (Suppl 563): 1-57

- 125.-Carstairs JR, Barnes PJ. Autoradiographic mapping of substance P receptors in lung. *Eur J Pharmacol* 1986; 127: 295-296
- 126.-Barnes PJ. Neuropeptides and airway smooth muscle. *Pharmac Ther* 1988; 36: 119-129
- 127.-Shore SA, Stimler-Gerard NP, Coast SR, Drazen JM. Substance P-induced bronchoconstriction in the guinea pig. Enhancement by inhibitors of neutral metalloendopeptidase and angiotensin-converting enzyme. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137: 331-336
- 128.-Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW, Evans RM. Production of a novel neuropeptide encoded by calcitonin gene via tissue specific RNA processing. *Nature* 1983; 304: 129-135
- 129.-Lundberg J, Franco-Cerceda A, Hua X, Hökfelt T, Fischer JA. Co-existence of substance P and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivities in sensory nerves in relation to cardiovascular and bronchoconstrictor effects of capsaicin. *Eur J Pharmacol* 1985; 108: 315-319
- 130.-Le Greves P, Nyberg F, Terenius I, Hökfelt T. Calcitonin gene-related peptide is a potent inhibitor of substance P degradation. *Eur J Pharmacol* 1985; 115: 309-311
- 131.-Sami IS. Influence of neuropeptides on airway smooth muscle. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: 552-558
- 132.-Uddman R, Moghimzadeh E, Sundler F. Occurrence and distribution of GRP-immunoreactive nerves fibres in the respiratory tract. *Arch Otorhinolaryngol* 1984; 239: 145-151



- 133.-Takemoto K, Carloquist M, Mutt V. Neuropeptide Y-a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* 1982; 296: 659-660
- 134.-Laitinen LA, Laitinen A, Salonen RO, Widdicombe JG. Vascular actions of airway neuropeptides. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: S59-S64
- 135.-Cheung A, Polak JM, Bauer FE, Cadieux A, Christofides ND, Spingall DR, Bloom SR. Distribution of galanin immunoreactivity in the respiratory tract of guinea-pig, rat and dog. *Thorax* 1985; 40: 866-869
- 136.-Gosney JR, Sissons MCJ, O'Malley JA. Quantitative study of endocrine cells immunoreactive for calcitonin in the normal adult human lung. *Thorax* 1985; 40: 866-869
- 137.-Lammers JW, Minette P, McCusker MT, Chung KF, Barnes PJ. Non-adrenergic bronchodilator mechanisms in normal human subjects in vivo. *J Appl Physiol* 1988; 64: 817-822
- 138.-Lammers JW, Minette P, McCusker MT, Chung KF, Barnes PJ. Non-adrenergic non-cholinergic bronchodilation stimulated by capsaicin inhalation in normal and asthmatic subjects (Abstract). *Am Rev Respir Dis* 1988; 137: A240
- 139.-Sibbald B, Rink E. Epidemiology of seasonal and perennial rhinitis clinical presentation and medical history. *Thorax* 1991; 46: 895-901
- 140.-Gómez Carrasco JA, Orive Iglesias I, Linares López P, Blanco Quiros A, Andion Dapena R. Historia natural de la polinosis en la infancia. *An Esp Pediatr* 1986; 24: 149-155
- 141.-Varney V. Hay fever in United Kingdom. *Clin Exp Allergy* 1991; 21: 757-762

- 142.-Busse WW, Redd CE, Hoechne JH. Where is the allergic reaction in ragweed asthma?.  
Demostration of ragweed antigen in airborne particles smaller than pollen. *J Allergy Clin Immunol* 1972; 50: 289-293
- 143.-Reed CE, Swanson MC, Agarwall MK, Yunginger JW. Allergen that cause asthma.  
Identification and quantification. *Chest* 1985; 87: 40S-44S
- 144.-Solomon WR. Uncovering "the fine details" of pollen allergen transport. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 74: 674-677
- 145.-Subiza E, Subiza J, Jerez M. Arboles, hierbas y plantas de interes alergológico en España.  
En: *Tratado de Alergología e Inmunología Clínica*. Vol.IV. Madrid: Luzan, 1986; pags. 257-366
- 146.-Connell JT. Quantitative intranasal pollen challenges III. The priming effect in allergic rhinitis. *J Allergy* 1969; 43: 33-44
- 147.-Habenicht HA, Burge HA, Muilenberg ML, Solomon WR. Allergen carriage by atmospheric aerosol. II. Ragweed pollen determinants in submicronic atmospheric fractions. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 74: 64-67
- 148.-Subiza J, Masiello JM, Subiza JL, Jerez M, Hinojosa M, Subiza E. Prediction of annual variations in atmospheric concentrations of grass pollen. A method based on meteorological factors and grain crop estimates. *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 540-546
- 149.-Cimarra M, Martínez-Cocera C, Las Heras P, Simon P, Bartolome JM, Panadero PJ, Dolz I. Concentraciones de polen atmosférico de Madrid. Estudio comparativo de 3 años. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin* 1987; 2: 7-10

- 150.-Subiza E. Incidencia de granos de polen en la atmósfera de Madrid. Método volumétrico. *Allergol e Immunopathol* 1980; (Suppl. VII): 261-276
- 151.-Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. *Flora Europaeae*. Vol. 5. Cambridge University Press, 1984; pags. 118-154
- 152.-González Bernández F. Gramíneas pratenses de Madrid. Madrid: Consejería de Agricultura y Ganadería, 1986
- 153.-Subiza J, Moneo I, Cuevas M, Hinojosa M, Armentia A, Subiza E, Jerez M, Losada E. *Trisetum paniceum*, un nuevo polen de interes en alergia presente en la atmósfera de Madrid. Estudio de la reactividad cruzada con otros pólenes de gramineas. *Rev Esp Alergol Immunol Clin* 1987; 2: 11-17
- 154.-Martin BG, Mansfield LE, Nelson HS. Cross-allergenicity among the grasses. *An Allergy* 1985; 54: 99-104
- 155.-Hargreave FE, Fink JN, Cockcroft DW. Workshop 4: The role of bronchoprovocation. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 78: 517-524
- 156.-Anderson SD. Bronchial challenge by ultrasonically nebulized aerosols. *Clin Rev Allergy* 1985; 3: 427-439
- 157.-Boulet LP, Legris C, Thibault L, Turcotte H. Comparative bronchial responses to hyperosmolar saline and methacholine in asthma . *Thorax* 1987; 42: 953-958
- 158.-Aldelroth E, Morris MM, Hargreave FE, O'Byrne PM. Airway responsiveness to leukotrienes C4 and D4 and to methacholine in patients with asthma and normal controls. *N Engl J Med* 1986; 315: 480-484

- 159.-Hardy CC, Robinson S, Tattersfield AE, Holgate ST. The bronchoconstrictor effect of prostaglandin D<sub>2</sub> in normal and asthmatic men. *N Engl J Med* 1984; 311: 209-213
- 160.-Joos G, Pauwels R, Van der Straeten M. Effect of inhaled substance P and neurokinin A on the airways of normal and asthmatic subjects. *Thorax* 1987; 48: 779-83
- 161.-Church MK, Featherstone RL, Cushley MJ, Mann JS, Holgate ST. Relationships between adenosine, cyclic nucleotides, and xanthines in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 78: 670-675
- 162.-Hardy CC, Bradding P, Robinson C, Holgate ST. The combined effects of two pairs of mediators, adenosine with methacholine and prostaglandin D<sub>2</sub> with histamine on airway caliber in asthma. *Clin Sci* 1986; 71: 385-392
- 163.-Foresi A, Chetta A, Corbo GM, Cuomo A, Olivieri D. Provocative dose and dose-response curve to inhaled propranolol in asthmatic patients with bronchial responsiveness to methacholine. *Chest* 1987; 92: 455-459
- 164.-Fuller RW, Dixon CMS, Cuss FMC, Barnes PJ. Bradykinin-induced bronchoconstriction in humans. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 176-180
- 165.-Du Toit JL, Woolcock AJ, Salome CM, Sundrum R, Black JL. Characteristics of bronchial responsiveness in smokers with chronic airflow limitation. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134: 498-501
- 166.-Pauwels R, Joos G, Van Der Straeten M. Bronchial responsiveness is not bronchial responsiveness is not bronchial asthma. *Clin Allergy* 1988; 18: 317-321
- 167.-Pratter MR, Woodman TG, Irwin RS, Johason B. Stability of stored methacholine chloride solution; clinical useful information. *Am Rev Respir Dis* 1982; 126: 717-719

- 168.-Cartier A, Maolo JL, Begin P, Sestier M, Martin RR. Time course of bronchoconstriction induced by inhaled histamine and methacholine. *J Appl Physiol* 1993; 54: 821-827
- 169.-Juniper EF, Frith PA, Dunnett C, Cockcroft DW, Hargreave FE. Reproducibility and comparison of responses to inhaled histamine and methacholine. *Thorax* 1978; 33: 705-710
- 170.-Pratter MR, Irwin RS. The clinical value of bronchoprovocation challenge. *Chest* 1984; 85: 260-265
- 171.-Holtzman MJ, Sheller JR, Dimeo M, Nadel JA, Boushey HA. Effect of ganglionic blockade on bronchial reactivity in atopic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1980; 122: 17-25
- 172.-Galvez RA, Mc Laughlin FJ, Levison H. The role of the methacholine challenge in children with chronic cough. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 79: 331-335
- 173.-Chan-Yeung M. Occupational asthma update. *Chest* 1988; 93: 407-411
- 174.-Juniper EF, Kline PA, Vanzielegheem MA, Ramsdale EH, O'Byrne PM, Hargreave FE. Effect of long-term treatment with inhaled corticosteroids (budesonide) on airway hyperresponsiveness and clinical asthma in nosteroids-dependent asthmatics. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 832-836
- 175.-Lambe BL, Norman PhS, Adams GK. The effect of aerosol distribution on airway responsiveness to inhaled methacholine in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 510-518
- 176.-Crockcroft DW, Berscheid BA. Measurement of responsiveness to inhaled histamine: comparison of FEV1 and SG aw. *Ann Allergy* 1983; 51: 374-379

- 177.-Chai H, Farr RS, Froehlich LA, Mathison DA, McLean JA, Rosenthal RR, Sheffer AL, Spector SL, Townley RG. Standardization of bronchial inhalation challenge procedures. *J Allergy Clin Immunol* 1975; 56: 323-327
- 178.-Chatham M, Bleecker ER, Norman P, Smith PL, Mason P. A screening test for airways reactivity: an abbreviated methacholine inhalation challenge. *Chest* 1982; 82: 15-18
- 179.-Ryan G, Dolovich MB, Roberts RS, Frith PA, Juniper EF, Hargreave FE, Newhouse MT. Standardization of inhalation provocation tests: two techniques of aerosol generation and inhalation compared. *Am Rev Respir Dis* 1981; 123: 195-199
- 180.-Crockcroft DW. Bronchial inhalation tests. I. Measurements of non allergic bronchial responsiveness. *Ann Allergy* 1985; 55: 527-
- 181.-Peat JK, Salome CM, Sedgwick CS, Kerrebijn J, Woolcock AJ. A prospective study of bronchial hyperresponsiveness and respiratory symptoms in a population of Australian schoolchildren. *Clin Exp Allergy* 1989; 19: 299-306
- 182.-Laitinen LA, Elkin RB, Empey DW, Jacobs L, Mills SJ, Gold WM, Nadel JA. Changes in bronchial reactivity after administration of live attenuated influenza virus. *Am Rev Respir Dis* 1976; 113: 194-201
- 183.-Backer V, Ulrik CS, Bach-Mortensen N, Glikmann G, Mordhorst CM. Relationship between viral antibodies and bronchial hyperresponsiveness in 495 unselected children and adolescents. *Allergy* 1993; 48: 240-247
- 184.-Dimeo MJ, Glen MG, Holtzman MJ, Sheller JR, Nadel JA, Boushey HA. Threshold concentration of ozone causing an increase in bronchial reactivity in humans and adaptation with repeated exposures. *Am Rev Respir Dis* 1981; 124: 245-248

- 185.-Härköen H, Nordman H, Korhonene O, Winbland I. Long-term effects of exposure to sulfur dioxide. Lung function four years after a pyrite dust explosion. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 890-893
- 186.-Orehek J, Massari JP, Cayrard P, Crimaud C, Charpin J. Effect of short-term, low level nitrogen dioxide exposure on bronchial sensitivity of asthmatic patients. *J Clin Invest* 1976; 57: 301-307
- 187.-Black JL, Schoeffel RE, Sundrum R, Berend N, Anderson SD. Increased responsiveness to methacholine and histamine after challenge with ultrasonically nebulised water in asthmatic subjects. *Thorax* 1985; 40: 427-432
- 188.-O'Byrne PM. Allergen-induced airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 81: 119-127
- 189.-Wilson NM, Dixon C, Silverman M. Increased bronchial responsiveness caused by ingestion of ice. *Eur J Respir Dis* 1985; 66: 25-30
- 190.-Wilson N, Vickers H, Taylor G, Silverman M. Objective test for food sensitivity in asthmatic children; increased bronchial reactivity after "cola" drinks. *Br Med J* 1982; 284: 1226-1228
- 191.-Haripersad D, Wilson N, Dixon C, Silverman M. Oral tartrazine challenge in childhood asthma; effect on bronchial reactivity. *Clin Allergy* 1984; 14: 81-85
- 192.-Trigg CJ, Jhalli N, Herdman MJ, Cundell DR, Thomas JM, Davies RJ. The daily variability of bronchial responsiveness to methacholine. *Eur Respir J* 1990; 3: 867-871
- 193.-Townley RG, Bewtra AK, Nair NM, Brodkey FD, Watt BA, Burke KM. Methacholine inhalation challenge studies. *J Allergy Clin Immunol* 1979; 6: 569-574

- 194.-Yan K, Salome CM, Woolcock AJ. Prevalence and nature of bronchial hyperresponsiveness with chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 25-29
- 195.-Hargreave FE, Ryan G, Thomson NC, O'Byrne PM, Latimer K, Juniper EF, Dolovich J. Bronchial responsiveness to histamine or methacholine in asthma: measurement and clinical significance. *J Allergy Clin Immunol* 1981; 68: 347-355
- 196.-Ryan G, Latimer KM, Dolovich J, Hargreave FE. Bronchial responsiveness to histamine: relationship to diurnal variation of peak flow rate, improvement after bronchodilator and airway calibre. *Thorax* 1982; 37: 423-429
- 197.-Hopp RJ, Bewtra AK, Nair NM, Townley RG. Specificity and sensitivity of methacholine inhalation challenge in normal and asthmatic children. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 74: 154-159
- 198.-Hargreave FE, Ramsdale EH, Pugsley SO. Occupational asthma without bronchial hyperresponsiveness. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130: 513-518
- 199.-Rhodes BJ, Casale TB, Donnelly AL, Weiler JM. Methacholine bronchial provocation challenge (MBPC): a non-diagnostic test?. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77 (Suppl.): 170-175
- 200.-Britt J, Cohen B, Menkes H. Functional deterioration in relatives of COPD patients. *Chest* 1977; 77 (Suppl.): 250-254
- 201.-Pichurko BM, Sullivan B, Porcelli RJ, McFadden ER. Endogenous adrenergic modification of exercise-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77: 796-801
- 202.-Anderson SD. Is there a unifying hypothesis for exercise-induced asthma?. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 73: 660-665



- 203.-Aitken ML, Marini JJ. Effect of heat delivery and extraction on airway conductance in normal and in asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131: 257-361
- 204.-Eggleston PA, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. A comparison of osmotic activation of basophils and human lung cells. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 1043-1048
- 205.-Larsson K, Hjemdahl P, Martinsson A. Sympathoadrenal reactivity in exercise-induced asthma. *Chest* 1982; 82: 561-
- 206.-Ind PW, Barnes PJ, Causon R, Brown MJ, Dollery CT. Plasma levels of histamine and catecholamines in exercise-induced asthma. *Br J Clin Pharmacol* 1983; 32: 145-147
- 207.-Lee TH, Nagakura T, Papageorgiou N, Cromwell O, Likura Y, Kay AB. Mediators in exercise-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 23: 634-639
- 208.-Gilbert IA, McFadden ER. Airway cooling and rewarming. The second reaction sequence in exercise-induced asthma. *J Clin Invest* 1992; 90: 699-704
- 209.-Lee TH, O'Hickey SP. Exercise-induced asthma and late phase reactions. *Eur Respir J* 1989; 2: 195-197
- 210.-Karjalainen J. exercise response in young men with asthma: no evidence for a late asthmatic reaction. *Thorax* 1991; 46: 100-104
- 211.-Anderson SD. Issues in exercise-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 76: 763-772
- 212.-O'Byrne PM, Jones GL. The effect of indomethacine on exercise-induced bronchoconstriction and refractoriness after exercise. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134: 69-72

- 213.-Eggleston PA, Rosenthal RR, Anderson SD, Anderton R, Bierman CW, Bleecker ER, Chai H, Cropp GJA, Johson JD, Koning P, Morse J, Smith LJ, Summers J, Trantlein JJ. Guidelines for the methodology of exercise challenge testing of asthmatics. *J Allergy Clin Immunol* 1979; 64: 642-645
- 214.-Cropp GJA. The exercise bronchoprovocation test: standardization of procedures and evaluation of response. *J Allergy Clin Immunol* 1975; 64: 627-632
- 215.-Asthma: a follow up statement from an international paediatric asthma consensus group. *Arch Dis Childs* 1992; 67: 240-248
- 216.-Yunginger JW. Clinical significance of IgE. En Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF Jr, Yunginger JW: *Allergy Principles and Practice*. 3rd.ed St. Louis/ Washington/ Toronto: The C.V. Mosby Company, 1988; pags.840-860
- 217.-Schellenberg RR, Adkinson NF Jr. Measurement of absolute amounts of antigen-specific human IgE by a radioallergosorbent test (RAST) elution technique. *J Immunol* 1975; 115: 1577-1583
- 218.-Möller C, Bjorkten B, Nilsson G, Dreborg S. The precision of the conjunctival provocation test. *Allergy* 1984; 39: 37-41
- 219.-Polgar G, Promadhat V. *Pulmonary function testing in children: techniques and standards*. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1971
- 220.-Sterk PJ, Fabbri LM, Quanjer PhH, Cockcroft DW, O'Byrne PM, Anderson SD, Juniper EF, Malo JL. Airway Responsiveness Standardized Challenge Testing with pharmacological physical and sensitizing stimuli. *Eur Respir J* 1993, 6 (Suppl. 16): 53-83

- 221.-Croner S, Kjellman N-IM. Natural history of bronchial asthma in childhood. A prospective study from birth up to 12-14 years of age. *Allergy* 1992; 47: 150-157
- 222.-Van Asperen PP, Kemp AS. The natural history of IgE sensitisation and atopic disease in early childhood. *Acta Paediatr Scand* 1989; 78: 239-245
- 223.-Schachter J, Higgins MW. Median onset age of asthma and allergic rhinitis in Tecumseh, Michigan. *J Allergy Clin Immunol* 1976; 54: 342-345
- 224.-Linna O, Kokkonen J, Lukin M. A 10 year prognosis for childhood allergic rhinitis. *Acta Paediatr Scand* 1992; 81:100-102
- 225.-Broder-Smith DM. A five year prospective survey of rural children with asthma and hay fever. *J Allergy* 1971; 47: 23-27
- 226.-Hagy GW, Sttipane GA. Risk factors for developing asthma and allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1976; 58: 330-336
- 227.-Anderson HR, Pottier AC, Strachan DP. Asthma from birth to age 23: incidence and relation to prior and concurrent atopic disease. *Thorax* 1992; 47: 537-542
- 228.-Smith JM. Studies of the prevalence of asthma in childhood. *Allergol Immunopathol* 1975; 3: 127-132
- 229.-Kjellman N-IM. Atopic disease in seven-year old children. Incidence in relation to family history. *Acta Paediatr Scand* 1977; 66: 456-471
- 230.- Lebowitz MD, Barbee R, Burrows B. Famili concordance of IgE atopy and disease. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 73: 259-264

- 231.-Ojeda JA. Historia natural del asma infantil. En Asma infantil. Jarpyo Editores SA. Madrid, 1985; pags. 7-22
- 232.-Townley RG, Quirgis HA, Bewtra A. IgE levels and methacholine inhalation response in monozygous and dizygous twins. *J Allergy Clin Immunol* 1975; 55: 92-97
- 233.-Bazarel M, Orgel HA, Hamburger RN. Genetics of IgE and allergy: serum IgE levels in twins. *J Allergy Clin Immunol* 1974; 54: 288-304.
- 234.-Gerrard JW, Rao DC, Morton EN. A genetic study of immunoglobulin E. *A J Hum Genet* 1978; 30: 46-58
- 235.-Cookson WOCM, Sharp PA, Faux JA, Hopkin JM. Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q. *Lancet* 1989; i: 1292-95
- 236.-Cookson WOCM, Young RP, Sandford AJ, Moffatt MF, Shirakawa T, Sharp PA, Faux JA, Julier C, Le Souef PN, Nakamura Y, Lathrop GM, Hopkin JM. *Lancet* 1992; 340: 381-384.
- 237.-Magnusson CG. Cord serum IgE in relation to family history and as predictor of atopic disease in early infancy. *Allergy* 1988; 43: 241-251.
- 238.-Lympny P, Welsh K, MacCochrane G, Kemeny D, Lee TH. Genetic analysis using DNA polymorphism of the linkage between chromosome 11q13 and atopy and bronchial hyperresponsiveness to methacholine. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 619-628
- 239.-Varjonen E, Kalimo K, Lammintausta K, Terho P. Prevalence of atopic disorders among adolescents in Turku, Finland. *Allergy* 1992; 47: 243-248

- 240.-Martinez FD, Morgan WJ, Wright AL, Holberg CT, Taussig LM. Diminished lung function as a predisposing factor for wheezing respiratory illness in infants. *N Engl J Med* 1988; 319: 1112-1117
- 241.-Frick OL, German DF, Mills J. Development of allergy in children. *J Allergy Clin Immunol* 1979; 63: 228-241
- 242.-Strannegard I-L, Strannegard O. Epstein-Barr virus antibody in children with atopic disease. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1981; 64: 314-319
- 243.-Sporik R, Holgate ST, Cogswell JJ. Natural history of asthma in childhood. A birth cohort study. *Thorax* 1991; 47: 1050-1053
- 244.-Zetterstrom O, Nordvall SL, Bjorksten B, Ahlstedt S, Stelander M. Increased IgE antibody responses in rats exposed to tobacco smoke. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 75: 594-598
- 245.-Ehrlich R, Kattan M, Godbold J, Saltzberg DS, Grimm KT, Landrigan PJ, Lilienfeld DE. Childhood asthma and passive smoking. Urinary cotinine as a biomarker of exposure. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 594-599
- 246.-Sherrill DL, Martinez FD, Lebowitz MD, Holdaway MD, Flannery EM, Herbison P, Stanton WR, Silva PA, Sears MR. Longitudinal effects of passive smoking on pulmonary function in New Zealand children. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145:1136-1141
- 247.-Hanrahan JP, Tager IB, Segal MR, Tosteson TD, Castile RG, Van Vunakis H, Weiss ST, Speizer FE. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 1129-1135
- 248.-Cookson WOCM, Craddock CF, Benson MK, Durham SR. Falls in blood eosinophils parallel the late asthmatic response. *Am Rev Respir* 1989; 139: 458-462

- 249.-Durham SR, Craddock CF, Cookson WOCH, Berson MK. Increases in aiway histamine responsiveness precede allergen-induced late asthmatic response. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 82:764-770
- 250.-Rachelefsky GS, Katz RM, Siegel SC. Chronic sinus disease with associaed reactive airway disease in children. *Pediatrics* 1984; 73: 526-529
- 251.-Zimmerman B, Stringer D, Feanny S. Prevalence of abnormalities foun by sinus x-ray in childhood asthma: lack of relation to severity of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 80: 268-273
- 252.-Novembre E, Veneruso G, Bernardini R, Marano E, Longobardi G, Sabatini C, Dragoni S, Di Francesco g, Vierucci A, Pellegrini T. Radiologic examination of the paranasal sinuses in asthmatic children. *Pediatr Med Chir* 1989; 11: 57-59
- 253.-Diéguez Y, Sanz ML, Oehling A. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1991; 1: 101-108
- 254.-Witting HJ, Belloit J, De Fillippi Y, Royal G. Age-related serum immunoglobulin E levels in healthy subjects and in patients with allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 1980; 66: 305-313
- 255.-Annesi Y, Oryszczyn MP, Frette C, Neukirch F, Orvoen-Frija E, Kauffmann F. Total circulating IgE and FEV1 in adult men. An epidemiologic longitudinal study. *Chest* 1992;101: 642-648
- 256.-Kuno-Skai H. Total serum IgE and specific IgE antibodies in children with bronchial asthma. *Ann Allergy* 1986; 56: 488-491

- 257.-Marsh DG, Myers DA, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Roebber M, Norman PS, Hsu SH, Bias WB. HLA-Dw2: a genetic marker for human immune response to short ragweed pollen allergen Ra5. Response after ragweed immunotherapy. *J Exp Med* 1982; 155: 1452-1481
- 258.-Blumenthal M, Marcus-Bagley D, Awdeh Z, Johnson B, Yunis E, Alper ChA. HLA-DR2 (HLA-B7, SC31, DR2), and (HLA-B8, SC01, DR3) haplotypes distinguish subjects with asthma from those with rhinitis only in ragweed pollen allergy. *J Immunol* 1992; 148: 411-416
- 259.-Dreborg S, Backman A, Basomba A, Bousquet J, Dieges P, Malling H-J. Skin tests used in type 1 allergy testing. Position paper. EAACI Subcommittee on Skin Tests. Dreborg S. de. *Allergy* 1989; 44 (Suppl.10): 1-59
- 260.-Malling H-J. Diagnosis and immunotherapy of mould allergy.II. Reproducibility and relationship between skin sensitivity estimated by end point titration and histamine equivalent reaction using skin prick test and intradermal test. *Allergy* 1985; 40: 354-362
- 261.-Stucky MS, Witt CS, Schmitt LH, Warlow R, Lattimore M, Dawkins RL. *J Allergy Clin Immunol* 1985;75:373-376
- 262.-García-Ortega P, Costa B, Richart C. Evaluation of the conjunctival provocation test in allergy diagnosis. *Clin Exp Allergy* 1989; 19: 529-32
- 263.-Eseverri JL, Gaig P, Marin AM, Botey J. El test de provocación conjuntival. Su valor en el diagnóstico de alergia a inhalantes. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin* 1989; 4: 27-30.
- 264.-Möller Ch, Elsayed S. Seasonal variation of the conjunctival provocation test, total and specific IgE in children with birch pollen allergy. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990; 92: 306-308

- 265.-Fennerty AG, Jones KP, Fifield R Challenge tests and specific IgE in hay fever sufferers. Clin Allergy 1987;17: 365-372
- 266.-Zwetchkenbaum JF, Skufca R, Nelson HS. An examination of food hypersensitivity as a cause of increased bronchial responsiveness to inhaled methacholine. J Allergy Clin Immunol 1991; 88: 360-364
- 267.-Corbo M, Ferrante E, Macciocchi B, Foresi A, De Angelis V, Fabrizi G, Ciappi G. Bronchial hyperresponsiveness in atopic dermatitis. Allergy 1989; 44:595-598
- 268.-Barker AF, Hirshman CA, D'Silva R, Hanifin JM. Airway responsiveness in atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol 1991; 87: 780-703
- 269.-Hanifin JM. Pharmacophysiology of atopic dermatitis . Clin Rev Allergy 1986; 4: 43-65
- 270.-Young S, LeSouef PN, Geelhoed G,Stick SM, Turner KJ, Landau L. The influence of a family history of asthma and parental smoking on the level of airway responsiveness in infants soon after birth. N Engl J Med 1991; 324: 1168-1173
- 271.- Checa A. Bronquitis asmática. Catarros habituales descendentes como posibles precursores de asma infantil. Tesis doctoral. Madrid, 1989
- 272.-Grainger DN, Stenton SC, Avery AJ, Duddridge M, Walters EH, Hendrick DJ. The relationship between atopy and non-specific bronchial responsiveness. Clin Exp Allergy 1990; 20 (2): 181-187
- 273.-Hopp RJ, Bewtra AK, Biven R, Nair NM, Townley RG. Bronchial reactivity pattern in nonasthmatic parents of asthmatics. Ann Allergy 1988; 61: 184-186



- 274.-Menon P, Rando RJ, Stankus RP, Salvaggio JE, Lehrer SB. Passive cigarette smoke-change studies: increase in bronchial hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 560-566
- 275.-Wiedemann HP, Mahler DA, Loke J, Virgulto JA, Snyder P, Matthay RA. Acute effects of passive smoking on lung function and airway reactivity in asthmatic subjects. *Chest* 1986; 89: 180-185
- 276.-Townely RG, Ryo UY, Kolotkin BM, Kang B. Bronchial sensitivity to methacholine in current and former asthmatic and allergic rhinitis patients and control subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1975; 56: 429-442
- 277.-Cockcroft DW, Berscheid BA, Murdock KY. Unimodal distribution of bronchial responsiveness to inhaled histamine in a random human population. *Chest* 1983; 751-754.
- 278.-Ramsdale EH, Morris MM, Roberts RS, Hargreave FE. Asymptomatic bronchial hyperresponsiveness in rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 75: 573-577
- 279.-Gerblich AA, Schwartz HJ, Chester EH. Seasonal variation of airway function in allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77: 676-681
- 280.-Braman SS, Barrows AA, DeCottis BA, Settippa GA, Corrao WM. Airway hyperresponsiveness in allergic rhinitis. A risk factor for asthma. *Chest* 1987; 91:671-674
- 281.-Boulet LP, Morin D, Milot J, Turcotte H. Bronchial responsiveness increases after seasonal antigen exposure in non-asthmatic subjects with pollen-induced rhinitis. *Ann Allergy* 1989; 63: 114-119
- 282.-Bel EH, Van der Veen H, Dijkman JH, Sterk PJ. The effect of inhaled budesonide on the maximal degree of airway narrowing to leukotriene D4 and methacholine in normal subjects in vivo. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 427-431

- 283.-Woolcock AJ, Salome CM, Yan K. The shape of the dose response curve to histamine in asthmatic and normal subjects. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130: 71-75
- 284.-Sterk PJ, Daniel EE, Zamel N, Hargreave FE. Limited bronchoconstriction to methacholine using partial flow-volume curves in nonasthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 272-277.
- 285.-Gleich GJ, Flarahan NA, Fujisawa T, Vanhoutte PM. The eosinophil as a mediator of damage to respiratory epithelium: a model for bronchial hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 81: 776-781
- 286.-Verdiani P, Di Carlo S, Baronti A. Different prevalence and degree of nonspecific bronchial hyperreactivity between seasonal and perennial rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 572-582
- 287.-Prieto L. Obstrucción al flujo aéreo e hiperexcitabilidad bronquial en la rinitis alérgica. *Rev Esp Alergol Inmunol Clín* 1990; 5:57-69
- 288.-Corren J, Adinoff AD, Irvin CG. Changes in bronchial responsiveness following nasal provocation with allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 611-618
- 289.-Brugman SM, Larsen GL, Henson PI, Irvin CG. Mechanisms for the increase of lower airway hyperresponsiveness induced by experimental sinusitis. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 107-112
- 290.-Aubier M, Levy J, Clerici C, Neukirch F, Herman D. Different effects of nasal bronchial glucocorticosteroid administration on bronchial hyperresponsiveness in patients with allergic rhinitis. *Am Rev Respir Dis* 1992; 148: 122-126

- 291.-Armitage JM, Sin Fai Lam K, Wilkinson Y, Faux JA, Hopkin JM. Investigation of the tendency to wheeze in pollen sensitive patients. *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 916-922
- 292.-Corren J, Adinoff AD, Buchmeier AD, Irvin CG. Nasal beclomethasone prevents the seasonal increase in bronchial responsiveness in patients with rhinitis and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 250-256
- 293.-Amaro-Galvez R, Mc Laughlin FJ, Levison H, Rashed N, Galdez-Sebalde M, Zimmerman B. Grading severity and treatment requirements to control symptoms in asthmatic children and their relationship with airway hyperreactivity to methacholine. *Ann Allergy* 1987; 59: 298-302
- 294.-Josephs LK, Gregg Y, Mullee MA, Holgate ST. Nonspecific bronchial reactivity and its relationship to the clinical expression of asthma. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 350-357
- 295.-Haynes RL, Ingram RH Jr, MacFadden ER Jr. An assessment of the pulmonary response to exercise in asthma and an analysis of factors influencing it. *Am Rev Respir Dis* 1976; 114: 739-752
- 296.-Kral B, Havel V, Tilsen P, Jirkal J, Elias J. Exercise induced bronchoconstriction; a long-term follow-up study (Abstract). *Allergol Immunopathol* 1989 1989; 5 (Suppl):29
- 297.-Godfrey S, Koning P. Exercise-induced bronchial lability in wheezy children and their families. *Pediatrics* 1975; 56 (Suppl): 851-855
- 298.-Pierson WE, Bierman CW. Free running test for exercise-induced bronchospasm. *Pediatrics* 1975; 56 (Suppl): 890-892

- 299.-Pelta Fernandez R, Gozalo Reques F, Colas Sanz C. Asma inducido por ejercicio e hiperventilación. En Tratado de Aergología e Inmunología Clínica. De. Luzan. 1986; 315-329
- 300.-Backer V, Ulrik CS. Bronchial responsiveness to exercise in a random sample of 494 children and adolescents from Copenhagen. Clin Exp Allergy 1992; 22: 741-747
- 301.-Eliason AH, Phillips YY, Rajagopal KR, Howard RS. Sensitivity and specificity of bronchial provocation testing. An evaluation of four techniques in exercise induced bronchospasm. Chest 1992; 102: 347-355
- 302.-Kawabori Y, Pierson WE, Conquest LL, Bierman CW. Incidence of exercise-induced asthma in children. J Allergy Clin Immunol 1976; 58: 447-455
- 303.-Custovic A, Arifhodzic N, Robinson A, Woodcock A. Exercise testing revisited. The response to exercise in normal and atopic children. Chest 1994; 105: 1127-1132
- 304.-Pinzone HA, Carlson BW, Kotses H, Creer TL. Prediction of asthma episodes in children using peak expiratory flow rates, medication compliance, and exercise data. Ann Allergy 1991; 67: 481-486
- 305.-Karjalainen J, Lindquist A, Laitinen LA. Seasonal variability of exercise-induced asthma especially outdoors. Effect of birch pollen allergy. Clin Exp Allergy 1988; 19: 273-278
- 306.-Fish JE, Ankin MG, Kelly JF, Peterman VI. Comparison of responses to pollen extract in subjects with allergic asthma and nonasthmatic subjects with allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol 1980; 65: 154-161
- 307.-Ahmed T, Fernandez RJ, Wanner A. Airway responses to antigen challenge in allergic rhinitis and allergic asthma. J Allergy Clin Immunol 1981; 67: 135-14

- 308.-Crimi E, Balbo A, Voltolini S, Troise C, Brusasco V, Negrini AC. Is the allergen-inhalation challenge predictive of the severity of seasonal asthmatic exacerbations?. *Allergy* 1993; 48: 202-206
- 309.-Spector S, Farr R. Bronchial inhalation challenge with antigens. *J Allergy Clin Immunol* 1979; 64: 580-586
- 310.-Peat JK, Salome CM, Bauman A, Toelle BG, Wachinger SL, Woolcock AJ. Repetability with methacholine bronchial challenge in a population of Australian schoolchildren. *Am Rev Respir Dis* 1991;144: 338-343.187
- 311.-O'Byrne PM, Ryan G, Morris M, Mc Cormack D, Jones NL, Morse IJC, Hargreave FE. Asthma induced by cold air and its relation to nonspecific bronchial responsiveness to methacholine. *Am Rev Respir Dis* 1982; 125: 281-285
- 312.-Chatman M, Bleecker R, Smith Ph, Rosenthal RR, Mason P, Norman Ph. A comparison of histamine, methacholine, and exercise airway reactivity in normal and asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1982; 126. 235-240
- 313.-Foresi A, Mattoli S, Corbo GM, Polidori G, Ciappi G. Comparison of bronchial responses to ultrasonically nebulized distilled water, exercise, and methacholine in asthma. *Chest*. 1986; 90 (822-826)
- 314.-Clough JB, Hutchinson SA, Williams JD, Holgate ST. Airway response to exercise and methacholine in children with respiratory symptoms. *Arch Dis Chil* 1991; 66: 579-583
- 315.-Bruce CA, Rosenthal RR, Lichtenstein LM, Norman PS. Quantitative inhalation bronchial challenge in ragweed hay fever patients: a comparison with radweed-allergic asthmatics. *J Allergy Clin Immunol* 1975; 56:331-336

- 316.-Kilian D, Cockcroft DW, Hargreave FE, Dolovich J. Factors in allergen-induced asthma: relevance of the intensity of the airway, allergic reaction and non-specific bronchial reactivity. *Clin Allergy* 1976; 6: 219-224
- 317.-Cockcroft DW, Murdock KY, Kirby J, Hargreave F. Prediction of airway responsiveness to allergen from skin sensitivity to allergen and airway responsiveness to histamine. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 264-267
- 318.-Busse WW, Swenson Ch.A. The relationship between plasma histamine concentrations and bronchial obstruction to antigen challenge in allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84: 658-666
- 319.-Crimi E, Voltolini S, Gianiorio P, Orengo G, Troise C, Brusasco V, Crimi P, Negrini AC. Effect of seasonal exposure to pollen on specific bronchial sensitivity in allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85: 1014-1019
- 320.-Paggiaro PL, Dente FL, Talini D, Bacci E, Vagaggini B, Giuntini C. Pattern of airway response to allergen extract of *Phleum pratensis* in asthmatic patients during outside the pollen season. *Respiration* 1990; 57: 51-56